

Universidade do Algarve

Unidade de Ciências e Tecnologias dos Recursos Aquáticos

**RESPOSTA FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA AO  
JEJUM NA DOURADA (*Sparus aurata*)**

Dissertação para a obtenção do grau de mestre  
em Aquacultura

Jessie Bosisio Melo

1997



TESES  
SD

Resposta fisiológica e  
bioquímica ao jejum na  
dourada (Sparus aurata) - Melo,

22381



**Universidade do Algarve**

**Unidade de Ciências e Tecnologias dos Recursos Aquáticos**

**RESPOSTA FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA AO  
JEJUM NA DOURADA (*Sparus aurata*)**

Dissertação para a obtenção do grau de mestre  
em Aquacultura

**Jessie Bosisio Melo**

1997

UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
SERVIÇO DE DOCUMENTAÇÃO

9/2/08	22381
F. 4. 2. 1. 2	
1166-1165	

↑

## AGRADECIMENTOS

Ao terminar este trabalho gostaria de deixar expresso o meu agradecimento a todos aqueles que, de alguma forma, tornaram possível a sua realização.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Deborah Power pela disponibilidade constante em ajudar e pelo grande interesse e dedicação com que acompanhou este trabalho,

À TIMAR, Culturas em Água, pelo fornecimento dos peixes utilizados nos ensaios deste trabalho,

Ao IPIMAR - Algarve e ao Dr. Pedro Pousão Ferreira pelas facilidades concedidas na utilização das suas instalações de Olhão,

Ao Dr. João Reis pela ajuda na montagem dos circuitos experimentais utilizados,

À Dra. Lília Brinca pelo auxílio prestado no tratamento estatístico dos dados; aos Drs. Jorge Gonçalves e Pedro Lino pela orientação dada na utilização do Sistema de Análise de Imagens; à Dra. Teresa Modesto por ter colaborado na realização de fotografias; às Dras. Adelaide Charrão, Cecília Santos e Eng. Regina Ervideira pela execução de técnicas cujos resultados permitiram enriquecer de forma significativa este trabalho,

A todos os colegas de laboratório e de mestrado que amavelmente estiveram sempre prontos a colaborar e a disponibilizar o seu tempo,

À minha família pelo apoio e compreensão manifestados, sobretudo nos muitos momentos em que eu não estive disponível.

Este mestrado foi financiado por uma Bolsa de Mestrado da JNICT - Programa PRAXIS XXI (BM/ 1162/94).

## Resumo

O presente trabalho teve por objectivo estudar os efeitos fisiológicos do jejum na dourada, uma das espécies com maior potencial para cultivo nos países mediterrâneos. Pretendeu-se investigar os efeitos da privação alimentar e da realimentação sobre o metabolismo hepático, sob duas temperaturas de cultivo diversas. Verificou-se que um período de jejum de 3 semanas provoca significativa redução no peso corporal e nos índices hepatosomático e de condição. Morfologicamente, observou-se intensa vacuolização do tecido hepático, além de diminuição da área dos núcleos e hepatócitos. Em termos metabólicos, o jejum implicou na mobilização de recursos energéticos a partir dos lípidos hepáticos, glicogénio e glucose plasmática. O aumento do teor de matéria húmida do músculo e fígado são indicadores da utilização de lípidos para fins de reposição energética. A expressão dos níveis de transtiretina (transportador das hormonas da tireóide) também foi significativamente reduzida. Um breve período de realimentação induziu à recuperação destes parâmetros a valores próximos aos normais com excepção da proteína plasmática e da transtiretina. A temperatura de cultivo não demonstrou ter influência sobre a severidade dos efeitos provocados pelo jejum. Tudo indica que a estratégia energética encontrada pela dourada para resposta adaptativa a situações adversas como o jejum é coerente com a natureza das suas fontes energéticas. Sendo o fígado o órgão metabolicamente mais activo, é também aquele que apresenta as suas reservas mais disponíveis para o uso imediato pelo organismo.

## Abstract

The present study was performed in order to investigate the effects of starvation on the physiology of seabream, one of the marine species with highest production potential in the mediterranean countries. The effects of food deprivation and refeeding on the liver were studied under two different rearing temperatures. A three weeks starvation period resulted in decrease of body weight, hepatosomatic and condition indices. Morphological changes were also observed and included the presence of a great number of droplets in the hepatic parenchima and the reduction of nuclear and hepatocyte area. In metabolic terms, food deprivation resulted in mobilization of energy sources from hepatic lipids, glycogen and plasma glucose. The increase of wet moisture content of muscle and liver suggest lipid mobilization for energy stores. Expression of transthyretin levels (transporter of thyroid hormones) was also significantly reduced. A short refeeding period was sufficient for recovery to almost normal levels with the exception of plasma protein and transthyretin. The rearing temperature did not appear to influence the effects caused by starvation. It seems that the energetic strategy chosen by the seabream for dealing with food depletion is consistent with the nature of its energy stores. As liver is metabolically the most active tissue its reserves appeared to be the most readily available for the organism.

## Índice

### 1 - Introdução

1.1 Caracterização da espécie .....	3
1.2 Sistema hepático dos vertebrados .....	3
1.3 Sistema hepático dos teleósteos .....	5
1.4 Principais funções do fígado .....	7

### 2 - Vias energéticas do organismo

2.1 Metabolismo dos hidratos de carbono .....	10
2.2 Regulação do metabolismo dos hidratos de carbono .....	12
2.3 Fisiologia do jejum .....	13

### 3 - Material e métodos

3.1 Material biológico .....	18
3.2 Instalações e parâmetros físico-químicos da água .....	18
3.3 Planeamento experimental .....	19
3.4 Plano de amostragens e recolha das amostras .....	20
3.5 Histologia do fígado .....	21
3.6 Análises bioquímicas .....	26
3.7 Índices e análises estatísticas .....	32

### 4 - Resultados

4.1 Morfologia hepática .....	33
4.2 Análises biométricas .....	41
4.3 Análises bioquímicas .....	44

5 - Discussão .....	49
---------------------	----

6 - Considerações finais .....	58
--------------------------------	----

7 - Referências bibliográficas .....	60
--------------------------------------	----

## Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina-5-monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensageiro
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Bovine serum albumine
H&E	Hematoxilina e eosina
I.H.S.	Índice hepatosomático
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
P.A.S.	Ácido periódico de Schiff
T <sub>3</sub>	Triiodotironina
T <sub>4</sub>	Tiroxina
TTR	Transiterina

## 1 - INTRODUÇÃO

A aquacultura marinha é uma actividade económica em expansão nos países europeus, onde as espécies produzidas atingem elevado valor nos mercados consumidores. As duas últimas décadas assistiram a um grande desenvolvimento da tecnologia do cultivo de peixes marinhos ao possibilitar o controlo de todas as fases do seu ciclo de vida em cativeiro.

De entre as espécies com interesse em piscicultura marinha a dourada, *Sparus aurata* ocupa um lugar de destaque, sendo uma das mais produzidas, em particular nos países mediterrâneos. O crescente interesse pelo seu cultivo é justificado não só pela sua alta taxa de crescimento, como também pela sua grande resistência a variações nos parâmetros ambientais, nomeadamente temperatura e salinidade. No entanto, a expansão do cultivo da dourada deve-se também ao declínio da sua captura pela pesca tradicional, incapaz de satisfazer as exigências actuais do mercado.

O sucesso de uma produção piscícola pressupõe um conhecimento biológico profundo da espécie que se pretende cultivar. O domínio dos seus mecanismos fisiológicos e metabólicos e das suas necessidades energéticas são alguns dos aspectos decisivos na optimização dos processos de cultivo. Assim sendo os estudos de fisiologia de uma espécie revestem-se de acrescida importância, pois visam contribuir para uma melhor compreensão das suas estratégias de sobrevivência e crescimento.

É crescente o interesse pela investigação da estrutura e funcionamento do sistema hepático dos teleósteos marinhos pois são escassos os registos de estudos existentes nas diversas espécies, comparativamente ao maior número encontrado para peixes de água doce (Rocha *et al.*, 1994). Este interesse em estudar o fígado reside no facto deste ser o órgão que certamente reúne o maior número de funções vitais num organismo animal. Desempenha um papel fundamental no metabolismo intermediário dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, sendo igualmente responsável por processos hematopoiéticos e de desintoxicação. O sistema hepático actua como uma autêntica interface entre o meio exterior e o sistema digestivo, por um lado e o meio

interno, por outro (Eckert *et al.*,1988). Anomalias desenvolvidas a nível do fígado podem ter como consequência a morte do organismo animal.

Além destas funções, o fígado tem uma participação activa no metabolismo endócrino, sendo o responsável pela síntese de diversas proteínas com funções hormonais ou que actuam como precursores ou transportadores de hormonas (Lehninger, 1975).

O presentê trabalho tem por objectivo (1) estudar inicialmente a estrutura macro e microscópica do fígado da dourada no seu estado fisiológico normal (2) investigar os efeitos da privação alimentar sobre o seu sistema hepático a nível morfológico e funcional, assim como sobre alguns dos seus principais parâmetros bioquímicos e metabólicos (3) verificar a influência da temperatura de cultivo sobre a ocorrência e intensidade destes efeitos.

## 1.1 Caracterização da espécie

A dourada européia (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) é um teleósteo marinho presente em toda a costa dos países mediterrâneos e na zona temperada do Atlântico Oriental. É uma espécie migradora que realiza a fase juvenil do seu ciclo de vida em lagoas costeiras e águas salobras de estuários. No inverno migra para profundidades maiores, provavelmente devido a sua maturação sexual e postura (Pillay, 1990). As fêmeas realizam posturas diárias num período que decorre entre Outubro e Fevereiro. Em termos reprodutivos a dourada caracteriza-se pelo seu hermafroditismo protândrico. No primeiro e segundo ano de vida estes peixes sofrem maturação sexual dos testículos, seguida por uma inversão sexual e a pela maturação dos ovários entre os 3 e 4 anos de idade.

Sendo uma espécie euriterma as douradas podem suportar temperaturas entre os 7° e 30°C, embora a temperatura ideal para o seu crescimento seja entre os 22° e os 25°C. Em condições de cultivo intensivo e sob uma temperatura favorável esta espécie pode alcançar 350 - 400 g em apenas 18 meses, apresentando assim a mais elevada taxa de crescimento entre as espécies produzidas tradicionalmente. Quanto ao seu comportamento alimentar trata-se de uma espécie carnívora que em meio natural se alimenta basicamente de moluscos bivalves, crustáceos e peixes (Morales, 1986).

## 1.2 Sistema hepático dos vertebrados

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo animal, onde encontra-se situado na cavidade abdominal, abaixo do diafragma. Assim como o pâncreas, este órgão desenvolve-se embriologicamente a partir de um desdobraimento do intestino primitivo.

Apresenta um sistema vascular característico uma vez que, ao contrário dos demais órgãos que recebem apenas sangue arterial, o fígado recebe considerável volume de sangue venoso, cerca de 70% do seu volume total, conduzido pela veia porta (Junqueira *et al.*, 1992). Através desta via recebe as moléculas absorvidas no intestino, provenientes da digestão dos alimentos ingeridos. Graças a esta circulação peculiar o fígado está em posição privilegiada para metabolizar os nutrientes e neutralizar substâncias tóxicas absorvidas.

A componente estrutural básica do fígado é a célula hepática ou hepatócito (do Grego *hepar*, fígado, + *kytos*). Estas células têm forma poliédrica podendo ter seis a oito faces e apresentam um núcleo central e esférico com um nucléolo bastante evidente.

Nos mamíferos o fígado apresenta uma estrutura lobular. Os hepatócitos estão dispostos em placas orientadas radialmente e que se anastomosam entre si formando os lóbulos hepáticos (Elias & Bengelsdorf, 1952). Estas unidades morfológicas tem a forma aproximadamente hexagonal, revelando-se como uma massa compacta e tridimensional de células. Os lóbulos estão estruturados de maneira a maximizar o contacto dos hepatócitos e o sangue que circula através do fígado.

Em algumas espécies animais, como no porco os lóbulos são particularmente bem delineados por uma bainha de tecido conjuntivo. Tal não se verifica na espécie humana e na grande maioria dos vertebrados. Nestes os lóbulos encontram-se justapostos em quase toda a sua extensão havendo apenas algumas regiões onde estão separados e que correspondem aos ângulos dos hexágonos (Elias, 1953).

Estes espaços são ocupados por um ramo da artéria hepática e um da veia hepática, um ducto biliar e vasos linfáticos, envoltos por tecido conjuntivo. Convencionou-se chamar estas regiões de *tracto* ou *triade portal*. Assim os tratos portais definem os cantos do lóbulo hepático e o seu centro é definido por um ramo da veia hepática, designada veia centrolobular.

Nestas espécies o lóbulo hepático caracteriza-se por uma conjunto contínuo de células, dispostas como tijolos em uma parede e perfuradas por uma complexa rede de capilares sinusóides, os quais estão separados entre si por apenas uma camada de células (Elias, 1953). Assim cada hepatócito é irrigado por sangue em pelo menos duas faces. Estes sinusóides resultam de múltiplas ramificações da artéria hepática e da veia porta, levando oxigénio e nutrientes a todas as células do parênquima hepático.

O sangue que percorre os sinusóides é recolhido no centro do lóbulo por um dos ramos das veias hepáticas, a *veia centrolobular*, dirigindo-se à veia cava inferior e retomando assim a circulação sistémica venosa.

Os sinusóides hepáticos apresentam-se como capilares sanguíneos cujas paredes estão revestidas por uma camada de células endoteliais típicas, mas também onde se distingue um outro tipo celular. São as células fagocitárias que neste órgão recebem o nome de *células de Kupffer*. Nestas células ocorre a fagocitose de hemácias

e a digestão de sua hemoglobina com a consequente produção de bilirrubina, uma das principais componentes da bile (Junqueira *et al.*, 1992).

Com o advento da microscopia eletrónica, observou-se, entre os hepatócitos e as paredes dos sinusóides, a existência de um estreito vão ao qual denominou-se *espaço de Disse*. Este espaço permite a livre passagem de moléculas entre os sinusóides e as células hepáticas, pois sua parede não possui um revestimento contínuo, apresentando orifícios.

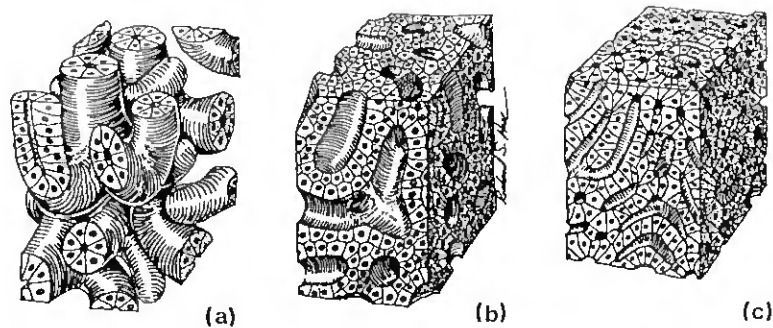
Além da proximidade que mantêm com os capilares sinusóides, os hepatócitos encontram-se em permanente contacto com uma extensa rede de diminutos canais, que percorrem todo o parênquima hepático. São designados *canaliculos biliares* e sua função é coletar e drenar a bile sintetizada pelos hepatócitos. Estes canaliculos não chegam a ter uma estrutura própria, sendo apenas canais limitados pela membrana plasmática de duas células adjacentes que projetam microvilosidades para o interior dos mesmos. Através destes canaliculos a bile secretada é conduzida para os *ductos biliares* que são estruturas tubulares de variados calibres, revestidos por células epiteliais cúbicas ou colunares. Estes por sua vez conduzem a um ducto biliar comum designado *ducto hepático* que finalmente sai do fígado e alcança o duodeno para onde a bile é drenada (Schimdt-Nielsen, 1985).

No entanto, a maior parte da bile produzida pelo fígado não é de imediato conduzida ao intestino, sendo primeiramente armazenada na vesícula biliar. Antes de alcançar o duodeno o ducto hepático ramifica-se, permitindo assim que a bile tenha acesso a esta estrutura, que lhe servirá de depósito. A vesícula biliar também tem por função concentrar a bile antes da sua expulsão para o tracto gastrointestinal, o que se dá através de um processo de osmose activo desenvolvido pelas suas células epiteliais (Eckert *et al.*, 1988).

### **1.3 Sistema hepático dos teleósteos**

Nos teleósteos e demais vertebrados não mamíferos, o fígado tem sido predominantemente descrito como uma glândula tubular, embora nos estudos já realizados sobre este tema tenha se verificado existir grande diversidade entre as espécies (figura 1). De acordo com esta estrutura, os hepatócitos estão dispostos em forma de túbulos que se anastomosam entre si e circundam os sinusóides. Cerca de

seis a dez hepatócitos localizam-se ao redor do sinusóide, que ocupa assim o centro do túbulo. No entanto foi observado por alguns autores (Hampton *et al.*, 1985) que o lumen desta estrutura tubular pode ser ocupado tanto por um sinusóide como por um canaliculo biliar.



**Figura 1.** Representação esquemática da estrutura tubular do fígado em peixes: (a) ciclóstomos; (b) e (c) teleósteos ( adaptado de Eurell & Haensly, 1982).

Neste arranjo tubular os ductos biliares e o sistema vascular estão distribuídos aleatoriamente por todo o parênquima hepático, não se verificando a presença de *triades* ou *tractos portais* a delimitar a organização tubular (Gonzalez *et al.*, 1993).

Outra característica da estrutura hepática dos teleósteos é que nestes os sinusóides encontram-se separados por duas camadas de células ao invés de uma, como se observa nos mamíferos e vertebrados superiores (Eurell & Haensly, 1982). Esta transição na parede celular de duas para uma célula representa um passo importante na evolução do sistema hepático dos vertebrados, uma vez que a presença de apenas uma camada de células torna mais fácil o acesso do fluxo sanguíneo aos hepatócitos, otimizando assim o funcionamento do fígado (Elias & Bengelsdorf, 1952).

Finalmente, em termos ultraestruturais, verifica-se que o citoplasma dos hepatócitos é rico em organelas, particularmente em retículo endoplasmático liso e rugoso, mitocôndrias e lisossomas. A presença destas estruturas reflete a extensa gama de actividades de síntese e degradação dos hepatócitos. Podemos também observar a ocorrência de gotas lipídicas e reservas de glicogénio no citoplasma destas células, o que dependerá do estado nutricional dos animais (Chapman, 1981).

## 1.4 Principais funções do fígado

O hepatócito é, sem dúvida, a célula de maior versatilidade fisiológica do organismo, pois exerce simultaneamente funções endócrinas e exócrinas. Além de sintetizar e acumular certos metabolitos, neutraliza e elimina substâncias tóxicas absorvidas pelo organismo. Esta multiplicidade funcional revela-se na morfologia hepática, cujas células podem apresentar um aspecto bastante diversificado. Entre as principais funções que o fígado desempenha destacam-se as seguintes:

### - Síntese proteica:

Além de sintetizar proteínas para sua própria manutenção, a célula hepática também sintetiza diversas proteínas plasmáticas tais como a albumina, a protrombina, o fibrinogénio e diversas lipoproteínas. Ao contrário do que se observa em outras glândulas, o hepatócito não acumula estas proteínas em seu citoplasma em grânulos de secreção, mas liberta-as continuamente para a corrente sanguínea, actuando assim como uma glândula exócrina (Stryer,1981).

### - Secreção da bile

O fígado não sintetiza enzimas digestivas, mas é responsável pela produção de bile, um fluido essencial para a digestão de gorduras. Os hepatócitos promovem o transporte activo de água e outros componentes do sangue para dentro dos canaliculos biliares que convergem até o ducto hepático, alcançando finalmente a vesícula biliar.

A bile é constituída por uma mistura aquosa de vários componentes, nomeadamente sais inorgânicos, ácidos biliares, colesterol e fosfolípidos. Estes ácidos desempenham importante função no metabolismo dos lípidos, pois emulsificam as gotas lipídicas permitindo uma mais fácil digestão destas moléculas pelas enzimas do tracto digestivo. Além desta função, os ácidos biliares também solubilizam o colesterol, facilitando a sua excreção pelo organismo (Wilson,1979).

Também fazem parte da bile os pigmentos biliares, a bilirrubina e biliverdina, ambos produtos do catabolismo da hemoglobina no sistema mononuclear fagocitário.

#### - Acumulação de metabolitos

Os lípidos e hidratos de carbono são armazenados pela célula hepática sobretudo pela forma de triglicérides e glicogénio. Esta capacidade de acumular material energético é de vital importância para a homeostase do organismo, pois permite que este tenha à sua disposição metabolitos no intervalo entre as refeições. Por esta razão o fígado é um potente indicador do estado de nutrição em que se encontra o animal (Hepher, 1988).

#### - Função Metabólica

No fígado ocorre a conversão de lípidos e aminoácidos em glucose, através de um complexo processo enzimático designado por gluconeogénese. Neste órgão também tem lugar a desaminação de aminoácidos com a produção de uréia, a qual será transportada pela corrente sanguínea até o sistema renal onde é excretada do organismo. O fígado ocupa igualmente um papel crucial na lipogénese, processo pelo qual os ácidos gordos reabsorvidos pela mucosa intestinal são transportados ao fígado por via linfática ou sanguínea. Neste órgão são armazenados em gotas lipídicas ou conduzidos para os tecidos extrahepáticos sob a forma de lipoproteínas plasmáticas (Cowey & Walton, 1988).

#### - Neutralização e desintoxicação

Várias drogas, tais como esteróides, barbitúricos e antihistamínicos são inactivadas no fígado onde sofrem processos de oxidação, acetilação, metilação e conjugação graças a presença de enzimas como a glucuroniltransferase, presente no retículo endoplasmático liso.

## 2 - VIAS ENERGÉTICAS DO ORGANISMO

O estudo da fisiologia hepática dos teleósteos passa pelo conhecimento detalhado das suas vias energéticas pois o fígado tem uma participação activa em todo o seu metabolismo intermediário.

O termo “metabolismo” descreve a cadeia de reacções, tanto catabólicas quanto anabólicas - em que os nutrientes ingeridos por um organismo são transformados em energia química. Esta energia destina-se à manutenção ou ao crescimento.

Os três principais grupos de nutrientes que compõem uma dieta alimentar e que participam neste processo são as proteínas, os lípidos e os hidratos de carbono. As proteínas sofrem deaminação de seus aminoácidos, gerando energia ou permitindo a síntese de novas proteínas. Os lípidos são metabolizados em ácidos gordos, utilizados para a síntese de membranas. Finalmente os hidratos de carbono são convertidos em monossacarídeos, sendo também utilizados para fins energéticos.

A regulação e as vias do metabolismo destes tres nutrientes foram inicialmente descritas em mamíferos, mas os estudos realizados em teleósteos confirmam estas mesmas características metabólicas (De Silva & Anderson, 1995).

A degradação dos aminoácidos, ácidos gordos e ácidos simples resulta em um composto intermediário comum - a acetyl coenzima A. Esta coenzima entra no ciclo do ácido cítrico, também conhecido como ciclo de Krebs, o qual conjuga-se com o processo de fosforilação oxidativa. O resultado destes caminhos metabólicos é a produção de  $\text{CO}_2$ , o consumo de  $\text{O}_2$  e a liberação de energia, a qual é armazenada sob a forma de adenosina trifosfato (ATP). Esta molécula actua como o principal intermediário nestas reacções pois a hidrólise das suas ligações de fosfato resultam num alto fluxo de energia, sendo o ATP considerado a maior fonte energética para grande parte das actividades celulares (Wilson, 1979).

O estudo dos efeitos provocados pela privação de alimento no funcionamento hepático requer a compreensão destes caminhos energéticos, ou seja, do metabolismo de cada nutriente e das suas interrelações num estado fisiológico normal de nutrição.

## 2.1 Metabolismo dos hidratos de carbono

Os hidratos de carbono presentes na dieta sofrem o processo de digestão e absorção pela mucosa do tracto digestivo, atingindo a circulação sanguínea como monossacarídeos ou açúcares simples ( glucose, fructose, galactose etc). Nos teleósteos e demais vertebrados, estes nutrientes são transportados para o fígado, onde os processos iniciais do metabolismo decorrem, embora estes venham a processar-se posteriormente em outros tecidos. Todavia o fígado é o primeiro tecido a ter a oportunidade de utilizar a glucose proveniente da dieta alimentar.

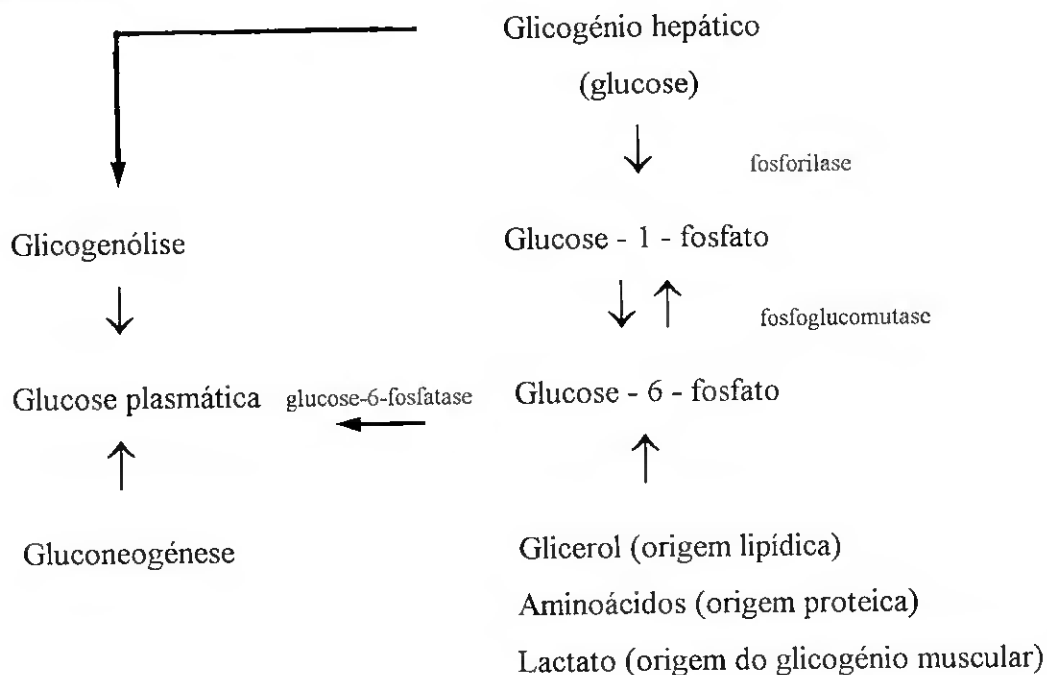
Entre os monossacarídeos a glucose desempenha o papel mais importante pois actua como precursora de diversas biomoléculas e de outros hidratos de carbono. Alguns tecidos, tais como o cérebro, utilizam-na como única fonte de energia do seu metabolismo, sendo a manutenção do nível mínimo de glucose na corrente sanguínea um dos requisitos vitais para um organismo vivo. Este dispõe de quatro vias para a obtenção de glucose, nomeadamente: a) glicólise - a quebra da molécula de glucose com liberação de energia; b) gluconeogénese - a síntese de glucose a partir de outras moléculas; c) síntese de glicogénio - o depósito do excesso de glucose na forma de moléculas de glicogénio; d) glicogenólise - a quebra da molécula de glicogénio, fornecendo glucose livre (Lehninger, 1975).

A maior parte da glucose absorvida pelas células epiteliais do tracto gastrointestinal é catabolizada nos tecidos através da via glicolítica, percorrendo duas fases distintas. Inicialmente a glucose é convertida em ácido pirúvico no citoplasma celular, sem requerer a presença de oxigénio. A segunda fase de seu metabolismo, onde o ácido pirúvico converte-se em acetyl coenzima A, ocorre a nível da mitocôndria celular e requer condições de aerobiose. Ambas as fases da via glicolítica apresentam uma série de reacções mediadas por um complexo conjunto enzimático.

Nos teleósteos, uma parte considerável das necessidades em glucose é atendida pelo processo de gluconeogénese. Participam desta reacção productos da glicólise (lactato e piruvato), intermediários do ciclo de Krebs (citrate e isocitrate), derivados do metabolismo das gorduras (ácidos gordos e glicerol) e grande parte dos aminoácidos. Quase toda a glucose livre produzida a partir da gluconeogénese é sintetizada no fígado (Gutierrez *et al.*, 1984).

A disponibilidade de glucose para os tecidos obedece ritmos, consoante o intervalo entre a ingestão de nutrientes, havendo períodos em que a concentração de glucose no sangue é excessiva e outros em que é insuficiente para atender as necessidades do animal. A fim de ultrapassar este ritmo instável, a glucose em excesso é polimerizada e armazenada no fígado sob a forma de glicogénio, sendo considerada não só um precursor como um activador da síntese de glicogénio. Este mecanismo envolve a estimulação da glicogénio sintetase, a enzima reguladora da biosíntese de glicogénio conjuntamente com a inibição do processo de glucogenólise. Quando requisitado pelo organismo, o fígado promove a conversão deste glicogénio em glucose circulante (Palmer & Ryman, 1972).

O músculo também armazena glicogénio, mas este, ao contrário do fígado não é afectado pelo estado de nutrição do animal, permanecendo relativamente constante. Este glicogénio não contribue directamente para a manutenção dos níveis de glucose no sangue pois a enzima glucose-6-fosfatase não está presente no músculo, mas fá-lo indirectamente através da formação de lactato. Na figura 2 estão ilustradas as alternativas de que dispõe o organismo para manter os níveis mínimos de glucose sanguínea.



**Figura 2.** Manutenção da glucose na corrente sanguínea (adaptado de Lehninger, 1975).

## 2.2 Regulação do metabolismo dos hidratos de carbono

Em peixes o metabolismo dos monossacarídeos difere em vários aspectos fundamentais do processo em mamíferos, particularmente no que diz respeito à sua regulação endócrina. É amplamente conhecida e documentada a intolerância destes animais à administração oral de glucose, pois esta causa-lhes um quadro sintomatológico semelhante ao da diabete em mamíferos. Os peixes, sobretudo os carnívoros como a dourada, apresentam pronunciada e persistente hiperglicemia no período que segue-se à administração de glucose oral, sendo uma das características do seu metabolismo endócrino o hipoinsulinismo (Palmer & Ryan, 1972). A baixa tolerância à glucose parece ser devida a uma insuficiência da secreção de insulina como demonstram os resultados de Gutierrez *et al.*, 1984.

A concentração de glucose sanguínea nos teleósteos está sujeita ao controlo das hormonas insulina e glucagon, ambas produzidas pelas células dos corpos de Brockmann, o pâncreas endócrino dos teleósteos. Os mecanismos de acção destas hormonas são antagonistas. Quando uma dieta rica em hidratos de carbono é fornecida aos peixes, a insulina estimula a actividade das enzimas glucolíticas hepáticas, inibindo a das enzimas gluconeogénicas, o que resulta numa queda imediata nos níveis de glucose no sangue. Por sua vez, são conhecidos os efeitos estimulantes do glucagon sobre a glicogenólise e a gluconeogénese o que traduz-se num estado de hiperglicemia (Hayashi & Ooshiro, 1985). No entanto, os estudos existentes sobre estas hormonas em peixes revelam que alguns pontos do seu mecanismo de acção são contraditórios (Sundby *et al.*, 1991).

Hipoglicemia é o mais evidente efeito da insulina em peixes, porém o papel desta hormona na homeostase da glucose é menos importante do que em mamíferos. Estudos realizados por Plisetskaya *et al.* (1984) e por Cowley & Sheridan (1993) ressaltam a importância da insulina na regulação do metabolismo das proteínas e dos lípidos, mais do que dos próprios hidratos de carbono. No fígado é reconhecida a acção estimulante da insulina sobre a síntese de proteína e sobre a lipogénese. Por outro lado, Lewis & Epple (1972) observaram que peixes submetidos a uma pancreatectomia não apresentaram sintomas de diabetes mellitus, o que mais uma vez questiona o papel da insulina na regulação dos hidratos de carbono.

### 2.3 Fisiologia do jejum

Ao contrário dos animais terrestres, os peixes estão sujeitos a períodos naturais de jejum ao longo do seu ciclo de vida. Estas fases de jejum são causadas por diversos factores, tais como alterações sazonais na disponibilidade de alimento no meio ambiente, quedas de temperatura das épocas invernais e migrações inerentes ao processo de reprodução. Consequentemente estes animais desenvolveram uma capacidade extraordinária de sobreviver a este estado. A tolerância à total abstenção de alimento em certas espécies de teleósteos pode estender-se, em alguns casos, de meses a anos; Love (1970) observou em peixes da espécie *Anguilla anguilla* uma sobrevivência ao jejum de aproximadamente 4 anos.

Assim como outros vertebrados, os peixes podem reduzir as suas necessidades energéticas durante o jejum diminuindo a sua taxa metabólica média, o que reflete-se na baixo consumo de oxigénio durante estes períodos (Johnston, 1980 cit. por Halver, 1989). Mesmo assim durante a privação de alimento os processos essenciais são mantidos pelo organismo às custas de energia armazenada, o que resulta num progressivo “gasto” dos tecidos corporais. A depleção das reservas de energia endógena varia entre os teleósteos, provavelmente em virtude da diversidade de adaptações que cada espécie desenvolve frente aos seus respectivos habitats.

A mobilização destas reservas de energia durante o jejum resulta em alterações acentuadas a nível de certos tecidos, quer a nível estrutural, quer a nível metabólico, sendo o tecido hepático aquele que possivelmente melhor reflete este processo. Estas alterações normalmente vem acompanhadas por mudanças a nível dos constituintes dos tecidos corporais, com aumento de uns e redução de outros, pois estes podem ser mobilizados a diferentes taxas.

É um facto reconhecido por diversos autores que o “stress” da privação alimentar induz a alterações reversíveis na estrutura hepática nomeadamente a nível histológico (Storch & Juario, 1983; Segner & Braunbeck, 1988; Strussmann & Takashima, 1989). Estes autores observaram respectivamente em *Chanos chanos*, *Leusciscus idus melanotus* e *Odontesthes bonarienses* uma redução na dimensão das células hepáticas e dos seus núcleos durante o jejum, detectáveis mesmo a nível de

microscopia óptica, o que justifica-se pela depleção de glicogénio que ocorre a nível do citoplasma.

Em termos de ultraestrutura hepática o jejum parece estar associado aos seguintes fenómenos: aumento do espaço intercelular, hipertrofia de lisossomas, redução do retículo endoplasmático rugoso e de glicogénio, para além do aumento de tamanho das mitocôndrias (Storch & Juario, 1983). Isto indica que mudanças no regime nutricional refletem-se igualmente em anormalidades a nível subcelular dos hepatócitos (Bucke & Feist, 1993).

Macroscopicamente também foram observadas alterações, nomeadamente uma acentuada atrofia do fígado e um aumento de volume da vesícula biliar, resultante do acúmulo de secreção biliar, pois esta provavelmente só é libertada sob o estímulo da ingestão de alimento (Halver, 1989).

Relativamente a idade dos peixes, sabe-se que a privação alimentar está entre os principais factores responsáveis pelas elevadas mortalidades registadas durante a fase larvar. A influência do jejum tem sido estudada em larvas de várias espécies de peixes, registando-se um estudo em larvas de dourada desenvolvido por Yúfera *et al.*, 1993. Verificou-se que a privação alimentar resulta em menor taxa de crescimento das larvas, além de ser responsável pela sua incapacidade de capturar o alimento quando é iniciada a alimentação exógena.

No que diz respeito à influência do jejum no metabolismo intermediário dos peixes, os principais parâmetros bioquímicos tem sido investigados em numerosos ensaios. A determinação das concentrações dos diversos metabolitos permite muitas vezes conhecer a sequência de utilização, a severidade de depleção ou o grau de manutenção das reservas energéticas de cada tecido durante o período de jejum.

Em teleósteos, diversos trabalhos tem sido feitos sobre os efeitos do jejum no perfil dos parâmetros metabólicos (Machado *et al.*, 1988; Ince & Thorpe, 1976; Mehner & Wieser, 1994) e os resultados destas investigações muitas vezes tem sido contraditórios, registando-se uma grande variabilidade entre as espécies. Estes efeitos parecem ser também influenciados pela extensão de tempo a que os animais são submetidos ao jejum e pela sua história nutricional prévia (Miglavs & Jobling, 1988).

Muitos trabalhos apontam a proteína muscular como uma das primeiras e mais importantes fontes de energia para os teleósteos durante o jejum (Machado *et al.*,

1988; Stirling, 1976; Black & Love, 1988). A perda rápida e progressiva de peso é um achado comum a todos os estudos sobre o jejum. Tendo-se em conta que o tecido muscular representa 60-70% do peso corporal em peixes, verifica-se a ocorrência de uma significativa perda de proteína muscular.

A depleção dos constituintes teciduais, um dos efeitos comuns a todas espécies privadas de alimento, resulta também na hidratação destes tecidos. As diferenças na perda de peso corporal que se observam em indivíduos que estiveram sob as mesmas condições de jejum devem-se em grande parte a mudanças no teor de água do tecido muscular; Love (1970), Jobling (1980) e Miglavs & Jobling (1988) apontam um considerável aumento na percentagem de matéria húmida no músculo branco de várias espécies de teleósteos. A incorporação de água no tecido muscular parece ser um mecanismo de compensação para as perdas orgânicas.

Assim como os constituintes teciduais, os metabolitos do sangue também alteram-se em resposta ao jejum. As concentrações de glucose sanguínea são directamente influenciadas pelo estado nutricional do animal, sendo a redução dos seus níveis um dos sinais mais marcantes em todos os ensaios em que os animais são privados de alimento (Mahajan & Dheer, 1983; Holloway *et al.*, 1994)

As respostas hematológicas e hematopoiéticas ao jejum são directamente influenciadas pela redução dos principais metabolitos do sangue em particular a glucose e o glicogénio hepático e muscular. Em termos de células do sistema imunológico, ensaios realizados por Mahajan & Dheer (1983) em *Channa punctatus* Bloch registaram uma maior sensibilidade por parte dos neutrófilos, eritrócitos e trombócitos após cinco semanas de jejum. A redução destes três tipos de células sugere que as reservas energéticas nos diversos tecidos foram consumidas a tal ponto que o seu metabolismo de ajuste ao jejum está fisiologicamente sob “stress”.

Estudos em *Salvelinus fontinalis* e *Oncorhynchus mykiss* efectuados por Holloway *et al.*, 1994 incidem nos efeitos do jejum sobre os níveis de certas hormonas no sangue, em especial das hormonas da tireóide. Estas podem influenciar o crescimento em peixes, pois a produção de T<sub>4</sub> estimula o aumento da taxa metabólica do organismo. Estes autores observaram uma diminuição na concentração de T<sub>4</sub> e na sua conversão para T<sub>3</sub> o que foi atribuído a uma redução na taxa metabólica ao nível mínimo durante a privação de alimento. Além disso estes estudos sugerem que o

catabolismo das reservas energéticas dos tecidos estão sob o controlo de hormonas adrenocorticais ,onde o cortisol pode estimular a mobilização lipídica pelo fígado.

A temperatura também pode influenciar a intensidade das alterações provocadas pela falta de alimento (Cowey, 1988). Assim no verão os efeitos do jejum são mais severos do que no inverno porque a taxa metabólica dos peixes eleva-se, ou seja mais energia é requerida quando as temperaturas do seu meio ambiente são mais altas. Naturalmente os peixes estão mais preparados para enfrentar o jejum, sem danos graves para o seu organismo, no inverno quando a oferta de alimento disponível reduz-se consideravelmente. Por outro lado os peixes não demonstram sinais de letargia nos períodos de jejum , o que deve-se talvez ao facto destes utilizarem preferencialmente o músculo branco como recurso energético, poupando o músculo vermelho para as actividades de movimento (Weatherley & Gill, 1981).

Em termos metabólicos, a grande maioria dos estudos apontam a via lipídica como a principal fonte energética a ser mobilizada pelos peixes quando privados de alimento. O fígado e o músculo esquelético são os locais de eleição para o armazenamento dos lípidos, onde estes são metabolizados em ácidos gordos. A via lipídica parece ser o melhor recurso de energia para os peixes, seguida pela via glucídica, pois em termos calóricos são libertados 9kcal/g de gordura enquanto que os hidratos de carbono libertam 5kcal/g. Os peixes tem grande capacidade de gluconeogénese o que facilita a manutenção do glicogénio hepático no jejum (Garcia de Frutos,1990).

É interessante notar que a grande maioria das alterações resultantes da privação de alimento, desde que esta não seja por um período muito extenso, são reversíveis e não patológicas. Ince & Thorpe (1974) , Machado *et al.* (1988) e Collins & Anderson (1995) observaram em *Exos lucius*, *Rhamdia hilarii* e *Macquaria ambigua* que após o jejum a realimentação promoveu, a curto e médio prazo, o retorno aos parâmetros normais, tanto a nível estrutural quanto funcional.

Num contexto de aquacultura em regime intensivo, o conhecimento das respostas fisiológicas dos peixes ao jejum pode ser útil no sentido de fornecer

indicadores bioquímicos, tais como a concentração de glucose plasmática por exemplo, que permitam aos criadores inferir sobre o estado nutricional dos animais.

Finalmente deve-se ter em consideração que as interrelações do metabolismo energético durante o jejum são complexas, o que torna impossível definir um modelo ou estratégia energética válida para todas as espécies de teleósteos.

### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material Biológico**

As douradas utilizadas neste trabalho foram obtidas na empresa de aquacultura Timar Culturas em Água S.A. (Livramento, Tavira) e provinham de um lote de animais com menos de 1 ano de idade, cultivados em tanques com 1ha de área e 1,5m de profundidade, em regime semi-intensivo. A renovação diária da água foi feita por bombagem ou através das marés, estando os tanques sujeitos às condições naturais de luz e temperatura.

O trabalho experimental deste projecto consistiu na execução de dois ensaios com o mesmo período de duração (28 dias), mas realizados em diferentes estações do ano o que alterou alguns parâmetros físico-químicos da água, em especial a temperatura de cultivo. Sendo um dos objectivos do presente estudo investigar a influência da temperatura da água nos efeitos provocados pelo jejum no sistema hepático, a repetição do ensaio no Inverno permitiu a comparação destes parâmetros.

#### **3.2 Instalações e parâmetros físico-químicos da água**

O primeiro ensaio teve lugar nas instalações do laboratório de aquacultura da Unidade de Ciências e Tecnologias dos Recursos Aquáticos da Universidade do Algarve, situado no campus de Gambelas e decorreu entre os dias 27 de Setembro e 27 de Outubro de 1995.

Utilizaram-se três tanques cilíndricos em fibra de vidro com a capacidade de 300 litros cada, a funcionar em circuito fechado, com um fluxo constante de água e arejamento. Deste circuito faziam parte também um tanque decantador, um reservatório de bombagem, uma escumadeira e um filtro biológico.

O segundo ensaio foi realizado na Estação de Aquacultura do IPIMAR/Algarve sediado em Olhão e decorreu no período entre 5 de Fevereiro e 5 de Março de 1996. Neste ensaio foram utilizados 2 tanques cilíndricos de 500 litros de capacidade cada, num circuito experimental a funcionar em sistema aberto. Este circuito foi abastecido com água da Ria Formosa pré-filtrada por filtros de areia e com uma renovação de 20%/hora.

Em ambos os ensaios a iluminação dos tanques foi feita de forma artificial, mas com simulação do fotoperíodo natural, resultando num total de aproximadamente 10 horas-luz.

Diariamente foram medidos os parâmetros físico-químicos da água encontrando-se os valores médio registados na tabela 1, onde também estão indicados os valores considerados óptimos para o cultivo da espécie em estudo.

Para além da observação destes parâmetros, procedeu-se a limpeza diária dos tanques durante todo o período experimental.

**Tabela 1:** Valores médios dos parâmetros físico-químicos da água registados nos 1º e 2º ensaios.

	1º Ensaio (Outono) 27 Set - 27 Out	2º Ensaio (Inverno) 5 Fev - 5 Março	Valores óptimos para a espécie( Barnabé,1991)
Temperatura (°C)	21,3	14,2	18 - 20
Salinidade(ppm)	37 ,5	33,4	33 - 35
pH	8,0	7,8	7,7 - 8,3
Oxigênio (mg/l)	7,1	7,3	7,0 - 8,0

### 3.3 Planeamento Experimental

Todos os peixes fornecidos pela Timar, destinados aos dois ensaios, foram inicialmente sujeitos a um tratamento profilático com antibiótico (furaltadona) na dose

de 2mg/l durante 24 horas. A seguir foram pesados e distribuídos aleatoriamente entre os tanques, sendo o seu peso médio inicial de 103.8 gramas.

A metodologia deste trabalho consistiu na determinação de 3 grupos experimentais, sendo o primeiro grupo sujeito a um regime de alimentação normal (controlo), o segundo grupo sujeito ao jejum e o terceiro grupo sujeito ao jejum seguido de realimentação.

Após um período de adaptação de uma semana, deu-se início ao primeiro ensaio no qual um total de 30 indivíduos foi distribuído nos 3 tanques em grupos de 10. Os peixes do grupo controlo foram alimentados com o granulado comercial nº 3 da Ewos a 5% do seu peso. Utilizaram-se alimentadores de tapete que de hora em hora administravam automaticamente a ração durante todo o período de iluminação dos tanques.

Os peixes testados no segundo ensaio foram transportados para as instalações do IPIMAR 3 meses antes deste ser iniciado, tendo passado, portanto, por um longo período de adaptação a este circuito. Nesta segunda experiência 38 peixes foram distribuídos em igual número nos 2 tanques tendo um deles representado o grupo controlo e o outro alojado os demais grupos experimentais (jejum e realimentação). O esquema de alimentação foi idêntico ao efetuado no 1º ensaio.

### **3.4 Plano de amostragem e recolha das amostras**

Em ambos os ensaios obedeceu-se ao mesmo plano de amostragem. O período experimental foi de 28 dias; a primeira amostragem foi feita ao 21º dia, onde foram sacrificados metade dos indivíduos do grupo controlo e metade dos indivíduos do grupo sujeito ao jejum. Aos animais restantes do grupo jejum foi fornecido alimento por uma semana e ao 28º dia efetuou-se a segunda amostragem onde procedeu-se ao sacrifício de todos os exemplares.

Para além do registo dos dados biométricos, foi extraído de cada indivíduo o fígado, uma amostra de sangue e um fragmento de músculo.

A obtenção das amostras foi realizada com base na seguinte ordem de procedimentos:

- . Os animais foram capturados com rede de mão movimentada, de modo a evitar ao máximo causar stress aos indivíduos, e alojados em recipientes com 10 litros de capacidade. Cada lote, contendo 4 a 5 peixes, logo que pescado, foi anestesiado com fenoxietanol na dose de 0,15ml/litro de água.
- . Cada peixe foi individualmente amostrado, tendo sido registado o seu peso e seu comprimento.
- . Procedeu-se a colheita de sangue por punção caudal lateral, utilizando-se seringas heparinizadas com uma solução de heparina de 4 a 5 mg/cm<sup>3</sup>.
- . Após a obtenção do sangue este foi centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos para separação do plasma. A seguir foi imediatamente congelado em azoto líquido para o transporte necessário até o laboratório, onde foi conservado a -20°C até ser analisado.
- . A seguir a colheita de sangue os animais foram sacrificados por decapitação e efetuou-se a evisceração de suas carcaças registando-se o seu peso sem vísceras.
- . O fígado foi retirado e pesado. Estando este órgão destinado a estudos morfológicos e bioquímicos, uma parte foi conservada em azoto líquido e congelada a -70°C para futuras análises e outra porção foi imersa em solução de Bouin-Hollande.
- . Extraíu-se também um pequeno fragmento de músculo (cerca de 0,600g) da região dorsal lateral, conservado em gelo para posterior análise do seu teor de humidade.

No que diz respeito às análises efetuadas a partir destas amostras algumas foram realizadas em ambos os ensaios, sendo descritas a seguir, enquanto outras foram particulares a cada ensaio. As análises da morfologia hepática foram de ordem qualitativa, através de técnicas histológicas e quantitativas por meio de um sistema informático de análise de imagem.

### **3.5 Histologia do fígado**

A observação histológica de tecidos de animais em experimentação é um instrumento de grande utilidade para visualizar as reacções causadas a nível celular por um determinado estado fisiológico. Neste trabalho procurou-se observar as diferenças





- Lavagem	água destilada .....	2 min
	água destilada .....	2 min
- Coloração	hematoxilina .....	2,5 min
	sol. de amonia a 1% .....	30 seg
	água corrente .....	3 min
	eosina .....	2,5 min
	sol. ácido acético a 0.2% .....	30 seg
	água corrente .....	3 min
- Desidratação	álcool metílico a 40% .....	1 min
	álcool metílico a 70% .....	1 min
	álcool metílico a 90% .....	1 min
	álcool metílico a 95% .....	1 min
	álcool metílico a 100% .....	2 min
	álcool metílico a 100% .....	2 min
- Diafanização	xilol .....	2 min
	xilol .....	2 min

A utilização desta técnica de coloração favorece o estudo das estruturas celulares do hepatócito, em especial o núcleo que é intensamente corado pela hematoxilina de Ehrlich's.

#### - Análises morfométricas

Para além da análise de cortes histológicos com a identificação das principais estruturas que caracterizam o tecido hepático, um dos critérios morfológicos mais representativos do grau de actividade celular deste tecido baseia-se na determinação do tamanho médio dos hepatócitos e dos seus núcleos. Obtem-se este parâmetro através da medição da área celular e nuclear.

Este estudo foi possível graças a utilização de um sistema informático de análise de imagem. Neste sistema as imagens vistas em um microscópio óptico, ao qual está adaptada uma câmara, são transmitidas para um monitor de televisão. Este monitor está conectado a um computador onde, através de um programa informático de análise de imagens podemos ter acesso às mesmas e efectuar diversos tipos de análises e medições. Neste trabalho utilizou-se o programa de análise de imagem “Optimas versão 4.0”, da empresa “Optimas Corporation, Seattle”.

A realização deste trabalho exigiu a elaboração de um estudo prévio das dimensões médias do núcleo e célula hepáticos em condições normais de nutrição, a fim de estimar o grau de uniformidade do tecido hepático em toda a sua extensão. Assim o fígado controlo foi testado de modo a ser possível avaliar se as alterações observadas foram devidas à variabilidade natural do tecido ou ao tratamento a que foram sujeitas.

Procedeu-se à extracção de 6 fígados que foram seccionados longitudinalmente em três partes: A (extremidade esquerda) ; B ( zona central) e C (extremidade direita). Destas três porções de cada fígado foram feitos cortes histológicos , corados pela H&E e analisados no Sistema de Análise de Imagem dentro das mesmas normas que foram examinados os grupos experimentais.

A seguir este estudo prévio, partiu-se para as análises dos três grupos sujeitos ao tratamento. Em cada grupo experimental foram analisadas amostras de fígado de 5 indivíduos. Destinaram-se para estas análises as preparações histológicas do fígado coradas pela H&E, tendo sido utilizadas duas secções histológicas para a análise de cada amostra.

Os parâmetros medidos foram a área das células hepáticas e dos seus respectivos núcleos expressos em  $\mu\text{m}^2$ . Em cada um dos ensaios foram efectuadas 50 medições de cada parâmetro em cada uma das 5 amostras, ( 250 áreas celulares e 250 áreas nucleares) perfazendo um total de 500 áreas medidas por grupo experimental. As imagens focadas e utilizadas para as medições foram as zonas centrais dos cortes histológicos e todas as lâminas foram vistas do lado esquerdo para o direito.

Este programa permite determinar uma região de interesse na imagem vista no monitor da televisão; esta região, uma vez demarcada, permanece a mesma em todas as imagens transmitidas pelo microscópio. Foi determinada uma zona de interesse na

região central das imagens, o que permitiu maior uniformização na escolha das células e núcleos a serem medidos.

#### **- Identificação do glicogénio hepático**

Esta identificação foi feita através de um método histoquímico denominado P.A.S. (Ácido Periódico de Schiff). A reação do P.A.S. é um ótimo indicador da presença de hidrato de carbonos nos tecidos, em particular o glicogénio. O princípio da reacção baseia-se inicialmente na formação de aldeídos e posteriormente na sua demonstração. O ácido periódico actua nas moléculas que possuem grupos hidroxil adjacentes, originando a produção de aldeídos. Estes aldeídos reagem com o ácido sulfuroso de fucsina, resultando na formação de um composto de coloração magenta. O reagente de Schiff foi preparado conforme o seguinte protocolo:

- . Dissolveu-se 1 g de Fucsina básica em 200 cm<sup>3</sup> de água destilada em ebulição.
- . Deixou-se arrefecer até aos 70° C e filtrou-se.
- . Aos 50° C, adicionou-se 1 g de metabissulfito de potássio e agitou-se bem.
- . Quando esta solução arrefeceu até à temperatura ambiente juntou-se 2 ml de ácido clorídrico.
- . Deixou-se repousar num lugar escuro durante a noite.
- . Adicionou-se 0,5 g de carvão activado, agitou-se por alguns minutos e filtrou-se.
- . Guardou-se a solução final, que deve ser incolor ou ligeiramente amarela, num recipiente escuro a 4°C.

Antes de se proceder à coloração com o reagente de Schiff, destinou-se um duplicado de cada lâmina à digestão com diastase. Desta maneira, usaram-se para cada amostra de tecido um par de lâminas, tratando-se uma delas com uma solução de 0,1% de diastase, durante 2 horas num banho-maria a 37°C. A coloração das lâminas pelo método P.A.S. obedeceu a seguinte metodologia:

- . Oxidação dos cortes com ácido periódico (1%) durante 10 minutos.
- . Lavagem com água da torneira, seguida por uma passagem por água destilada.
- . Depois de escurridas, as lâminas foram colocadas num recipiente de vidro dentro de uma caixa escura e cobertas com o reagente de Schiff durante 30 minutos.
- . Lavagens repetidas com água sulfurosa (1g de metabissulfito de sódio diluído em 100 ml de água destilada e 5 ml de ácido clorídrico).

- . Lavagem com água da torneira por 10 a 15 minutos.
- . Lavagem com água destilada por 15 a 20 minutos.
- . Desidratação dos cortes histológicos, de acordo com as soluções e períodos de tempo descritos para a preparação da técnica de H&E.
- . Montagem com DPX.

### 3.6 Análises bioquímicas

A aplicação dos métodos a seguir descritos teve por objectivo avaliar o efeito da privação alimentar sobre alguns dos principais parâmetros metabólicos do organismo, assim como sobre a constituição de certos componentes corporais.

#### - Determinação da glucose plasmática

Procedeu-se à determinação da glucose plasmática através do método da Hexoquinase. Este método é totalmente enzimático, utilizando as enzimas hexoquinase e glucose-6-fosfato dehidrogenase. Baseia-se na reacção em que glucose + ATP, catalisados pela enzima hexoquinase, formam glucose-6-fosfato + ADP. Numa segunda fase, glucose-6-fosfato + NAD, desta vez mediados pela enzima glucose-6-fosfato dehidrogenase, reagem formando NADH. A produção de NADH provoca um aumento de absorbância. Uma vez que a quantidade de NADH produzida é directamente proporcional a quantidade de glucose presente o aumento na absorbância indica portanto a concentração de glucose da nossa amostra.

Para a realização desta análise utilizou-se um kit fornecido pelo laboratório Randox Lda com os seguintes constituintes:

- . solução tampão (4mmol/l de ATP, 3 mmol/l de NAD, ions Magnésio 15mmol/l)
- . solução de enzimas ou reagente enzimático (hexoquinase  $\geq 25U/ml$ ; glucose-6-fosfato dehidrogenase  $\geq 75U/ml$ ).

É de referir que este kit, para além do plasma, presta-se à determinação de glucose em diversos fluidos tais como sangue, soro, urina e líquido cerebrospinal.

Este método consistiu em cumprir as seguintes etapas:

- . Preparou-se uma solução de glucose com a concentração de 100 mg/dl. A partir desta solução foram feitas 5 alíquotas com respectivamente 10, 20, 30, 40 e 50 µl, diluídas na solução tampão, tendo-se elaborado uma curva padrão.
- . Pipetou-se 10 µl de cada amostra em tubos eppendorf. Nos 3 grupos experimentais 100% dos indivíduos foram testados.
- . Em cada tubo adicionou-se 990 µl de solução tampão fazendo um volume de final de 1 ml (1000µl).
- . Agitaram-se as amostras no “vortex” e mediu-se a absorvância (A1).
- . Pipetou-se 10 µl do reagente enzimático em cada tubo.
- . Agitaram-se novamente as amostras no “vortex” e procedeu-se à incubação dos mesmos por 5 minutos a 37°C.
- . Mediu-se a absorvância(A2) dentro do período de 30 minutos.
- . A absorvância da amostra é obtida pela seguinte operação:  $A2 - A1 = A$  amostra
- . A leitura das absorvâncias foi feita em espectrofotómetro a 3 comprimentos de onda: 365 nm, 340 nm e 334nm. A absorvância final para cada amostra foi o valor médio destas 3 leituras.

#### **- Determinação da proteína plasmática total**

Procedeu-se ao doseamento da proteína total em amostras de plasma com base numa versão modificada do método de Lowry ( Lowry *et al.*,1951). Este método caracteriza-se pelo desenvolvimento de uma cor azulada na solução final, o que indica a presença de proteína. O aparecimento desta cor azulada resulta inicialmente da reacção da proteína com o cobre; secundariamente a redução do reagente de Folin pela proteína tratada com o cobre virá acentuar o desenvolvimento da cor. Ambas as reacções ocorrem em meio alcalino.

Assim sendo, a intensidade da cor desenvolvida é proporcional à quantidade de proteína presente na amostra.

Descreve-se a seguir o procedimento para o doseamento de proteínas pelo método de Lowry:

Reagentes:

A - solução de 2% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em NaOH 0,1% .

B - solução de 0,5% de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  em citrato de sódio a 1%.

C - 1 ml de B + 50 ml de A (preparado imediatamente antes de cada análise).

D - Reagente de Folin diluído em 1/2 de água destilada.

Preparação das soluções padrão ( em duplicado)

Solução de BSA em NaOH 0,1 % (1 mg/ ml)	NaOH 0,1 %
Volume em $\mu\text{l}$	Volume em $\mu\text{l}$
0	100
10	90
20	80
30	70
40	60
50	50
60	40
70	30
80	20
90	10
100	0

Preparação das amostras para análise:

As amostras de plasma foram diluídas de 1/10 em solução tampão (NaOH 0,1%).  
Destas alíquotas foi retirado 30 $\mu\text{l}$ ; juntou-se 70 $\mu\text{l}$  de NaOH 0,1% (volume final de 100 $\mu\text{l}$ ).

Reacção colorimétrica:

Ao padrão ou à amostra adicionou-se sucessivamente:

1 ml de C, agitou-se de imediato no “vortex” e aguardou-se 10 minutos

100  $\mu\text{l}$  de D, agitou-se de imediato no “vortex” e aguardou-se 30 a 90 minutos

Procedeu-se à leitura das amostras em espectrofotómetro a 750 nm.

A partir dos valores de absorvâncias obtidos e com referência à curva padrão foram determinadas as concentrações de proteína presentes nas amostras de plasma.

## - Extração de ARN total

A extração de ARN total, do qual faz parte o ARN mensageiro permite-nos obter informação codificante para diversas hormonas, proteínas e polipeptídeos, pois as moléculas de ARNm presentes num determinado tecido indicam-nos os genes que estão a ser ali expressos.

O ARN total extraído foi utilizado na execução de um “Northern Blot”, com o objectivo de estudar-se a expressão da transiterina em um regime de alimentação normal e de privação alimentar.

O método seguido para a extração do ARN total foi o de Chomczynski & Sacchi (1987), o qual possibilita que mesmo de pequenas quantidades de tecido seja recuperado o ARN total.

Utilizaram-se as amostras de fígado congeladas, tendo-se determinado a concentração de ARN total através da leitura de absorvância desta solução medida num espectrofotómetro a 260 nm. Avaliou-se a qualidade da extração feita pelo rácio entre as leituras a 260 e 280 nm: um rácio entre 1.8 e 2.0 indica um bom grau de pureza do extracto, enquanto que um rácio abaixo de 1,6 sugere a ocorrência de contaminação por proteínas. Verificou-se também a pureza dos extractos submetendo-se as amostras à técnica de eletroforese em minigel de agarose e as amostras foram mantidas a - 70° C até a sua utilização para a análise “Northern Blot”.

## - “Northern Blot”

Em vertebrados, a transiterina (TTR) é uma das três proteínas plasmáticas importantes no transporte das hormonas da tireóide, sendo produzida principalmente no fígado e no plexo coróide. A sua síntese hepática é extremamente sensível aos níveis de proteína ingeridos e a taxa de energia consumida tendo sido apontada como um indicador do equilíbrio nutricional de um organismo (Hayden *et al.*, 1994).

A realização desta análise teve por objectivo determinar de que modo alterações no estado nutricional podem afectar a expressão da transiterina no fígado da dourada.

### **- Radioimunoensaio**

A análise das hormonas estudadas neste trabalho, respectivamente  $T_3$  e  $T_4$  foi feita por intermédio de radioimunoensaios (RIA). Os imunoensaios, dos quais os radioimunoensaios fazem parte consistem num conjunto de técnicas, nas quais a quantificação da substância em estudo é feita através da sua ligação com anticorpos específicos. O fundamento deste método baseia-se na competição entre as moléculas de um antigénio marcado radioativamente (marcador) e de outro não marcado (hormona a ser testada) para um número fixo de locais de ligação nas moléculas do anticorpo. A aplicação do método consiste na elaboração de uma curva padrão, utilizando-se quantidades conhecidas de hormona não marcada e de marcador e na subsequente determinação da quantidade de hormona presente na amostra em estudo por interpolação relativamente a esta curva padrão.

Para a realização destas três técnicas (extração de ARN total, “Northern Blot” e radioimunoensaio) contou-se, respectivamente, com a colaboração das Dras. Adelaide Charrão, Cecília Santos e Eng<sup>a</sup> Regina Ervideira a quem expresso agradecimentos.

### **- Determinação dos lípidos totais no fígado**

A fração lipídica total do tecido hepático foi extraída com base na utilização de clorofórmio e metanol. Através de um processo de agitação vigorosa da amostra com estes dois solventes à temperatura ambiente, os lípidos totais são extraídos sem alterações profundas da sua estrutura, podendo ser usados para posterior caracterização.

Este método também prevê a adição de água a esta mistura de solventes, de modo a facilitar a sua separação, ficando os lípidos dissolvidos na camada inferior, correspondente à camada de clorofórmio. Após a separação das camadas de solventes aplicam-se cloreto de sódio para precipitar os materiais proteicos e sulfato de sódio para eliminar possíveis resíduos de água.

O clorofórmio é finalmente evaporado num recipiente tarado e o resíduo lipídico pesado. O procedimento a ser seguido neste método compreende as seguintes etapas:

- . Pesou-se 1,0 g de amostra em um gobelé, onde juntou-se 2,5 ml de clorofórmio, 5 ml de metanol e 25 µl cloreto de magnésio a 20%.
- . Agitou-se vigorosamente durante 2 minutos.
- . Juntou-se mais 2,5 ml de clorofórmio e voltou-se a agitar.
- . Juntou-se 2,5 ml de água destilada e tornou-se a agitar por 2 minutos.
- . Filtrou-se através de um filtro de porcelana, usando-se sucção moderada, para um kitasato.
- . Efetuaram-se três lavagens das paredes do gobelé e do kitasato com 2,5 ml de clorofórmio, a fim de ser eliminado qualquer resíduo. Transferiu-se a mistura para tubos de ensaio.
- . Agitou-se e centrifugou-se a 2000 rpm durante 5 minutos.
- . Removeu-se cuidadosamente a camada sobrenadante com uma pipeta, sem tocar na camada de clorofórmio.
- . Adicionou-se à camada de clorofórmio 5 ml de solução de cloreto de sódio a 0,1% e agitou-se por inversão lenta, 5 ou 6 vezes.
- . Centrifugou-se novamente a 2000 rpm durante 5 minutos. Retirou-se a camada aquosa, como anteriormente.
- . Juntou-se 2 gramas de sulfato de sulfato de sódio anidro, tapou-se o tubo e agitou-se vigorosamente.
- . Filtrou-se através de um filtro de porcelana para um kitasato e lavou-se cuidadosamente as paredes do tubo e do filtro com 3 x 2,5 ml de clorofórmio, a fim de eliminar qualquer resíduo lipídico.
- . Transferiu-se o extracto de clorofórmio para um frasco vazio, cujo peso já tinha sido previamente registado.
- . Submeteu-se esta mistura a um banho de vapor até a evaporação total do clorofórmio.
- . Colocou-se o frasco com o resíduo lipídico numa estufa a 100° C durante 5 minutos.
- . Depositou-se este frasco num exsiccador, onde depois de arrefecido, foi pesado.

. A determinação da fração lipídica foi feita através do seguinte cálculo:

- Peso da amostra (g) = P<sub>1</sub>

- Peso do frasco vazio (g) = P<sub>2</sub>

- Peso do frasco + residuo lipídico = P<sub>3</sub>

$$\text{- Lípidos Totais (\%)} = \frac{P_3 - P_2}{P_1} \times 100$$

### **- Determinação do teor de matéria húmida no músculo branco e no fígado**

A quantificação do teor em água destes tecidos foi efetuada por diferença de peso antes e após a secagem das amostras, numa estufa a 80° C, durante uma semana. Após este período efetuaram-se pesagens diárias até o momento em que os valores estabilizaram-se, sendo considerados os pesos finais. Este teor de matéria húmida foi expresso em percentagem a partir do seguinte cálculo:

$$\% \text{ de matéria húmida} = \frac{\text{peso da amostra húmida} - \text{peso da amostra seca} \times 100}{\text{peso da amostra húmida}}$$

### **3.7 Índices e análises estatísticas.**

No cálculo dos índices morfológicos foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Índice Hepatosomático} = (\text{peso do fígado} \times 100) / \text{peso}$$

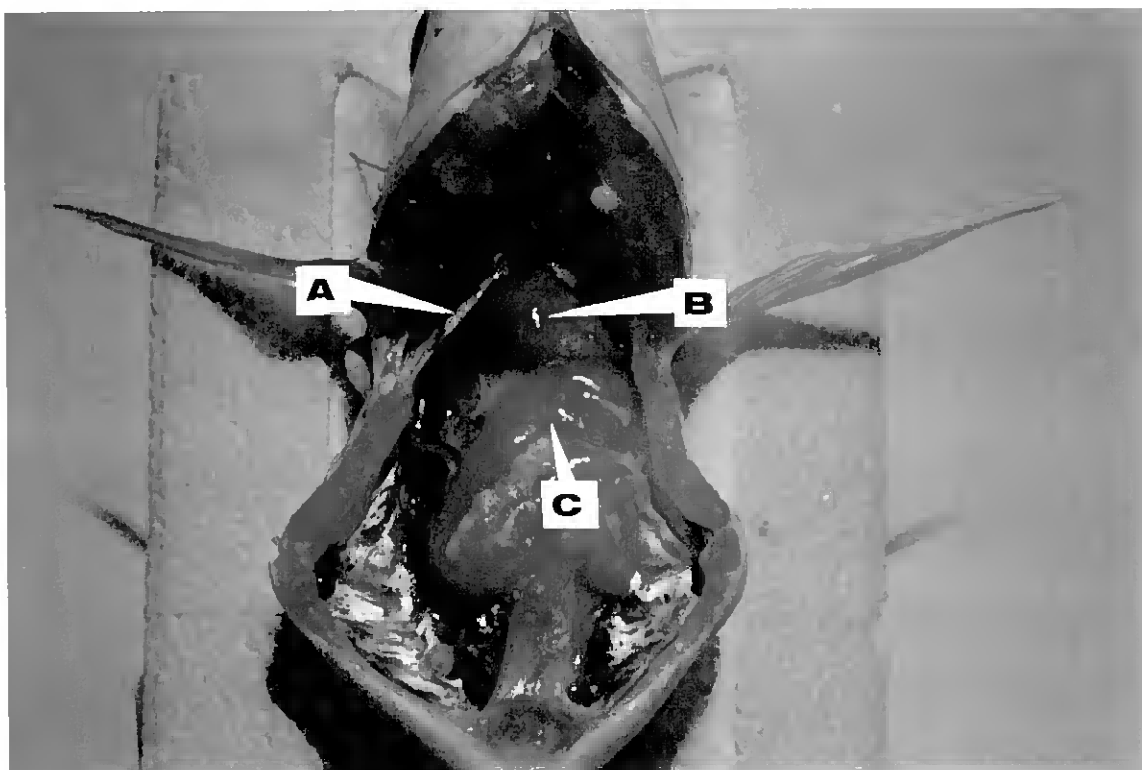
$$\text{Índice de Condição} = \text{peso} \times 100 / (\text{comprimento})^3$$

Para cada análise efetuada foram calculadas a média e o desvio padrão dos valores obtidos nos três grupos experimentais. A comparação dos efeitos de cada tratamento foi feita através da utilização do teste-t (Student), pois este teste permite-nos detectar se há diferenças significativas entre os tratamentos aplicados. Utilizou-se dois níveis de significância ( $\alpha = 0,05$  e  $\alpha = 0,01$ ).

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 Morfologia hepática:

Tal como em grande parte dos teleocósteos, o fígado da dourada apresenta uma forma anatómica alongada e uma coloração castanha, ocupando dentro da cavidade abdominal uma posição anterior em relação ao tracto digestivo e intestinal. Estende-se junto ao diafragma (figura 3) encontrando-se em seu lado direito a vesícula biliar em forma de saco. O pâncreas não aparece como um órgão isolado, mas sim de forma difusa, principalmente localizado ao redor da veia hepática.



**Figura 3.** Vista ventral da cavidade abdominal da dourada onde A representa o fígado, B o diafragma e C o intestino.

## - Histologia

A análise das seções histológicas de fígado coradas pela H&E revela que a estrutura geral do tecido hepático da dourada em tudo assemelha-se à aquela já descrita para a grande maioria dos teleosteos.

Verificou-se que as células hepáticas estão organizadas radialmente em forma de túbulos, os quais ramificam-se e anastomosam-se repetidamente. O hepatócito apresenta-se na típica forma hexaédrica, contendo um núcleo esférico ocupado por um nucléolo. Uma rede extensa de sinusóides percorre todo o tecido hepático, sendo circundados por grupos de seis a oito hepatócitos ( figura 5).

Elementos vasculares, venosos e arteriais, assim como os ductos biliares apresentam-se aleatoriamente distribuídos pelo parênquima hepático (figura 4), sendo detectada apenas a presença ocasional de algumas tríades portais. Os ductos biliares são observados em pequenos grupos ou isolados, e caracterizam-se pelo seu epitélio cuboidal ou colunar (figura 5). A sua frequência de distribuição ao longo do tecido hepático mostra-se uniforme. Os vasos sanguíneos de grande e médio calibre também apresentam seu aspecto característico, circundados por uma fina camada de tecido conjuntivo. Estão presentes ao longo de todo o parênquima hepático, não raro contendo células sanguíneas no seu lúmen. As arteríolas surgem isoladas, mas por vezes encontram-se acompanhadas por um ducto biliar. Notou-se a ocorrência de considerável quantidade de gotas lipídicas, muitas vezes adjacentes aos maiores ductos biliares (figura 4).

No grupo experimental submetido ao jejum a principal alteração a nível histológico, para além da redução na área nuclear e celular, foi, em alguns casos, uma vacuolização extensa do parênquima hepático (figura 6). No entanto, as preparações histológicas deste grupo não resultaram tão bem quanto as dos grupos controlo e realimentação, pois os fígados em jejum apresentaram uma consistência frágil e facilmente fragmentavam-se. As alterações observadas foram mais a nível quantitativo do que propriamente qualitativo. No grupo da realimentação o parênquima hepático apresenta-se com aspecto bastante semelhante aos dos animais normalmente nutridos, evidenciando-se a forma hexaédrica típica dos hepatócitos (figura 6).

### - Coloração pelo método P.A.S.

Sendo esta técnica um diagnóstico qualitativo da presença de glicogénio no fígado, estabeleceu-se a seguinte escala para a análise e classificação dos cortes histológicos quanto ao seu teor:

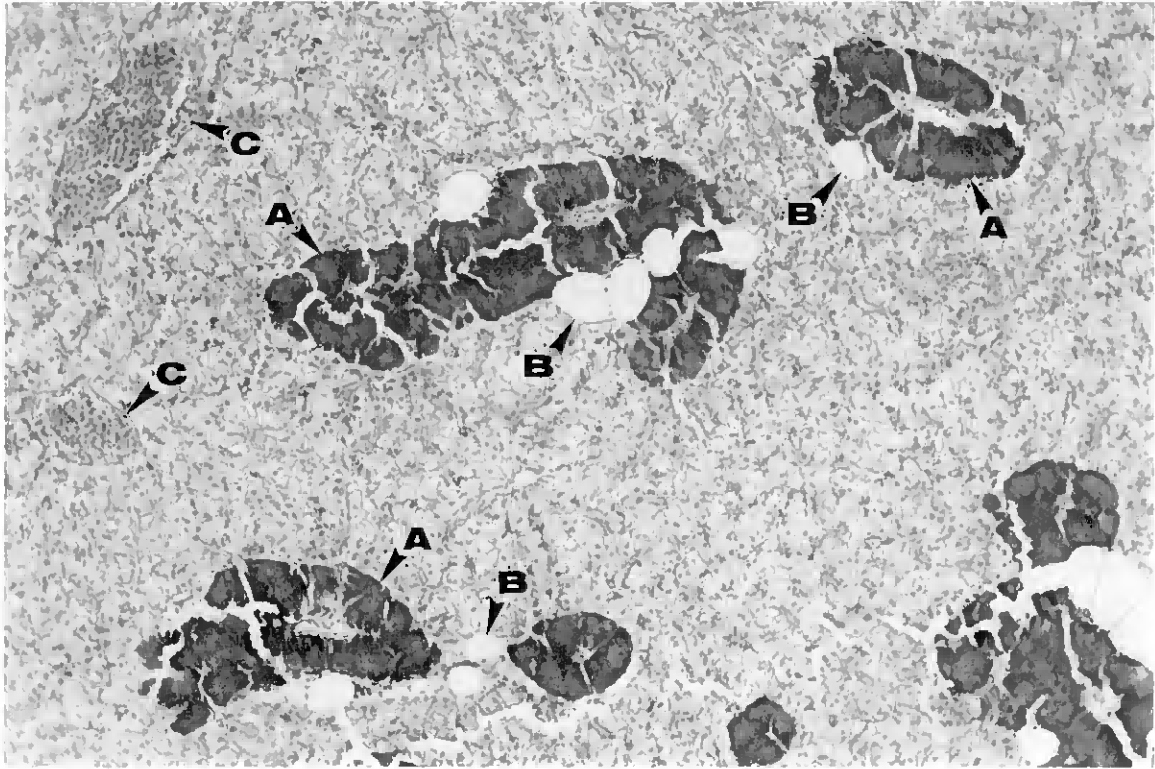
- hepatócitos onde não foi detectada a presença de glicogénio.
- + hepatócitos com reduzida quantidade de grânulos de glicogénio.
- ++ hepatócitos com moderada quantidade de grânulos de glicogénio.
- +++ hepatócitos densamente carregados com grânulos de glicogénio.

Tendo em conta a subjectividade inerente à aplicação deste género de escalas, submeteu-se a análise dos cortes histológicos a dois observadores. É oportuno lembrar que o primeiro e segundo ensaios deste trabalho serão referidos, em todos os resultados a seguir apresentados como, respectivamente Outono e Inverno. Assim as observações obtidas foram as seguintes:

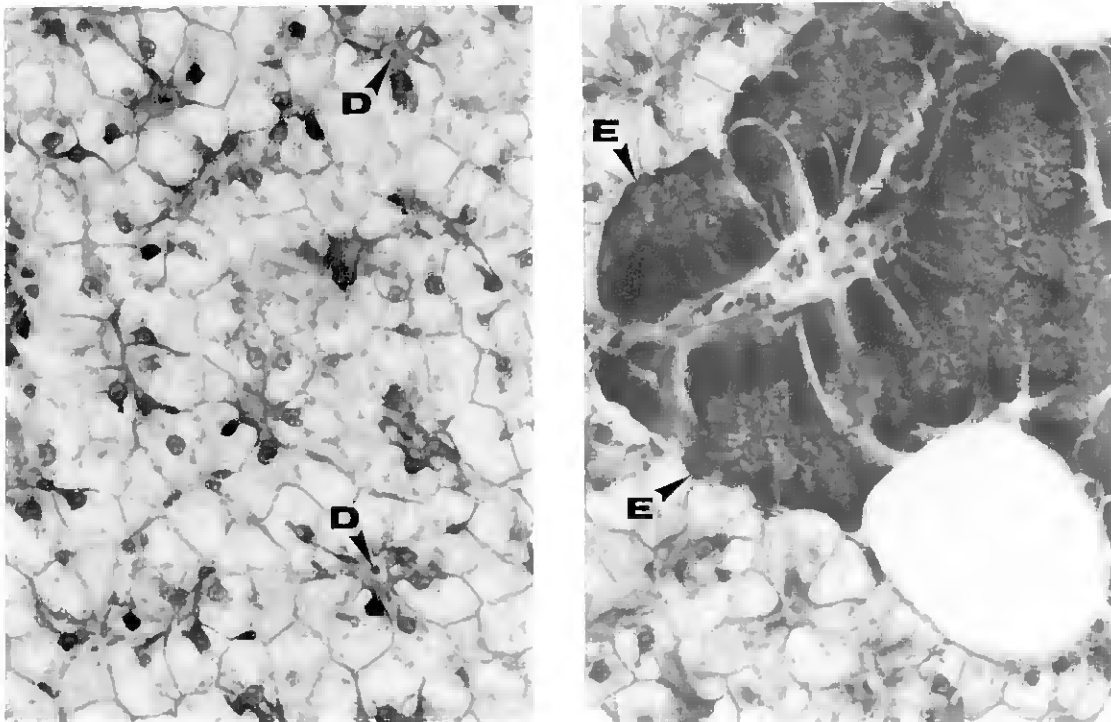
**Tabela 2.** Teor de glicogénio hepático (método de coloração P.A.S.). Para cada amostra de fígado foram observadas seis secções histológicas.

	n	Outono	Inverno
Controlo	3	++ +	+ + +
Jejum	3	+	+ / -
Realimentação	3	++	++

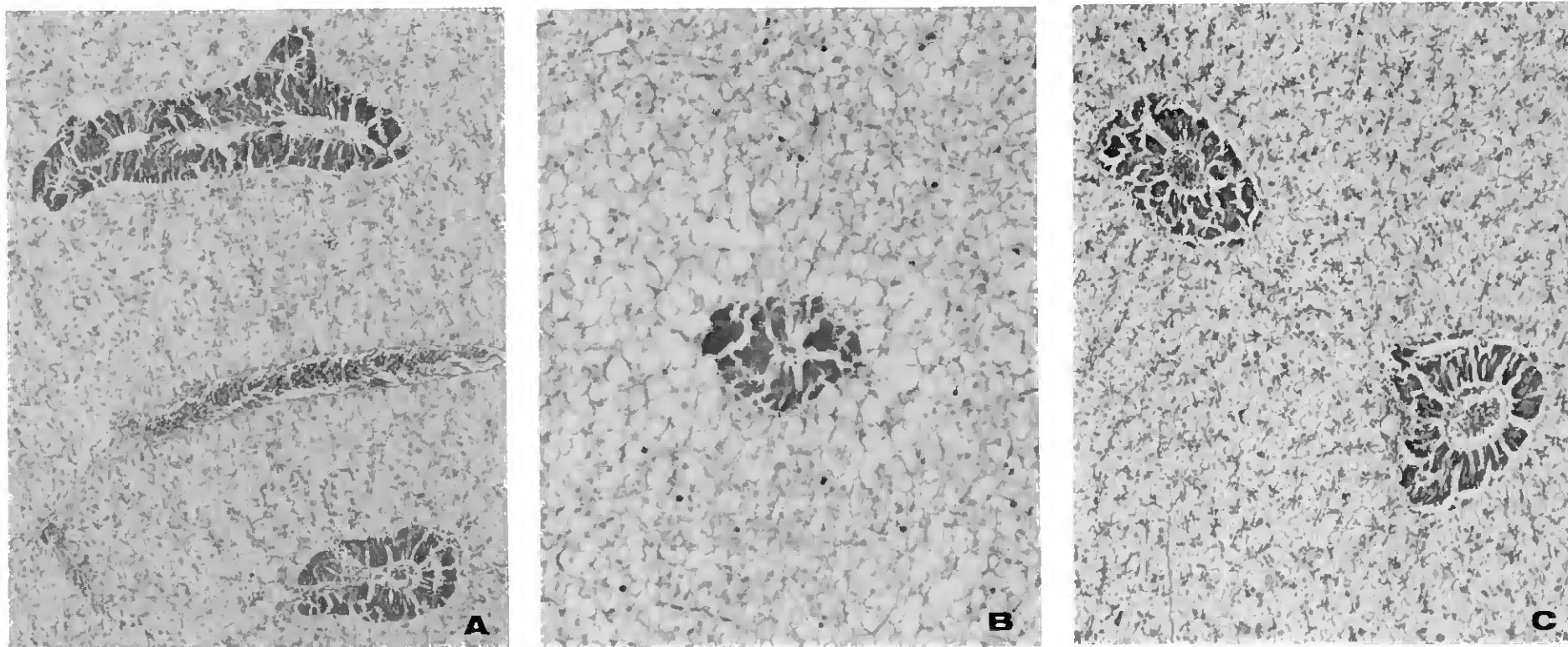
Constatou-se a presença acentuada do glicogénio no tecido hepático sujeito a um regime de alimentação normal, o que já era previsto pois o fígado é um tecido rico neste metabolito. A privação de alimento provocou uma redução marcante de glicogénio o qual passa a ser utilizado na síntese de glucose. A realimentação implica numa presença moderada de grânulos de glicogénio (figura 7). Não foram encontradas diferenças significativas nos resultados entre os dois ensaios.



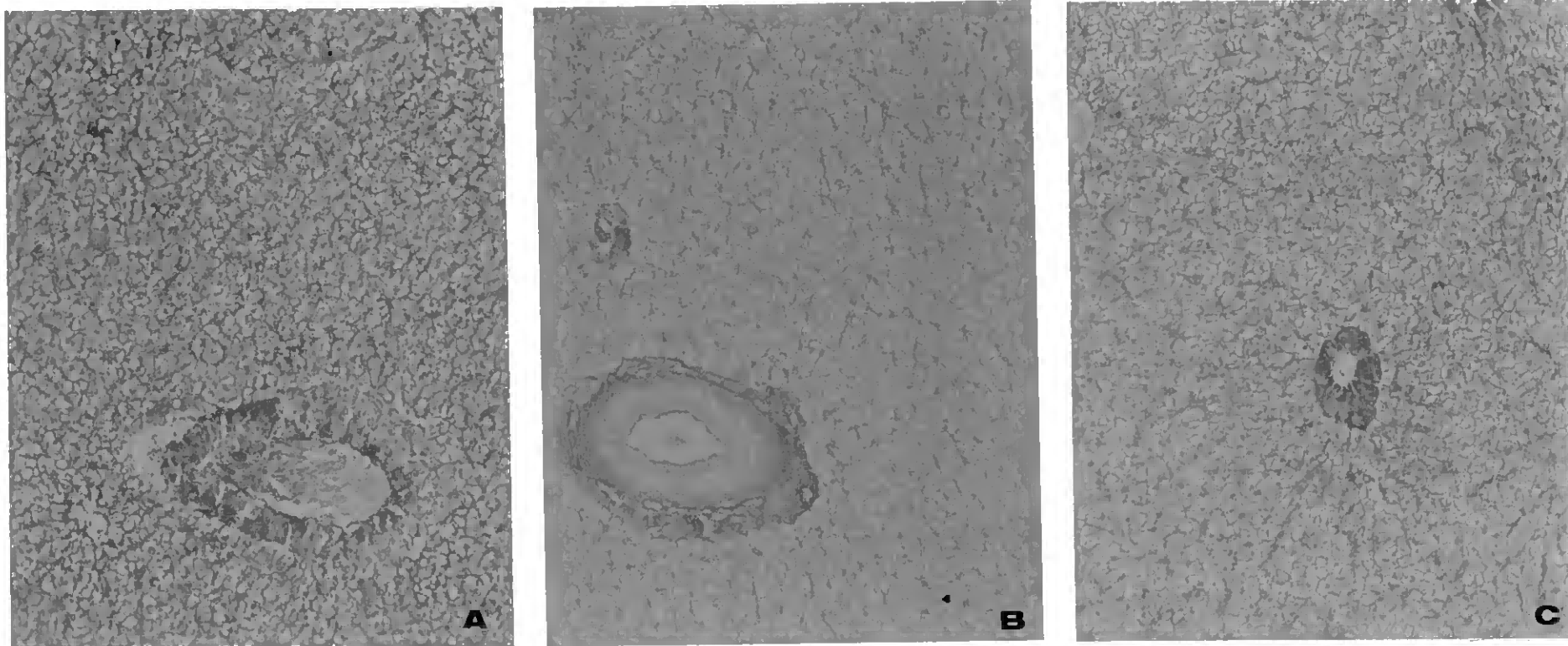
**Figura 4.** Imagem histológica do fígado com a presença de estruturas morfológicas características: ductos biliares (A) com gotas lipídicas adjacentes (B) e vasos sanguíneos eferentes de grande calibre (C). H&E x 100.



**Figura 5.** Hepatócitos com a típica forma hexaédrica, agrupados ao redor de sinusóides (D); pormenor de um ducto biliar com o característico epitélio colunar (E), H&E x 400.



**Figura 6.** Imagens histológicas do fígado sujeito a um regime de alimentação normal (A), ao jejum (B) e a realimentação (C). No jejum (B) nota-se a presença de vacúolos no tecido hepático e a destruição celular (H & E x 200).



**Figura 7.** Imagens histológicas do fígado coradas pelo método P.A.S.(x 100) sujeito a um regime de alimentação normal (A), ao jejum (B) e à realimentação (C). Observa-se a redução do glicogénio hepático no jejum (B).

### - Sistema de Análise de Imagem

No estudo prévio realizado no tecido hepático normal as três zonas do fígado estudadas (A:extremidade esquerda; B:zona central e C:extremidade direita) apresentaram considerável homogeneidade nas áreas de suas células e núcleos, não havendo diferenças significativas (tabela 3). Tal conclusão permitiu-nos avançar no estudo dos efeitos do jejum e realimentação sobre o fígado, partindo do princípio que apenas os tratamentos e não uma variabilidade própria do tamanho e forma das células, consequente à sua disposição no fígado, seriam responsáveis pelas respostas.

**Tabela 3.** Valores médios da área dos núcleos e hepatócitos ( $\mu\text{m}^2$ )  $\pm$  desvio padrão, obtidos a partir de 50 medições realizadas em cada zona do fígado de 6 indivíduos (total de 900 medições). Para cada indivíduo foram analisadas três secções histológicas de fígado.

	Área Nuclear	Área Celular
Zona A	24,96 $\pm$ 1,9	219,62 $\pm$ 21,77
Zona B	24,59 $\pm$ 2,3	224,71 $\pm$ 20,65
Zona C	24,35 $\pm$ 2,1	222,31 $\pm$ 20,18

Os resultados relativos aos efeitos do jejum e da realimentação sobre a área dos núcleos e células hepáticas estão representados na tabela 4. Verificam-se em ambos os casos que as diferenças são altamente significativas ( $\alpha=0,01$ ) em relação ao grupo controle. Houve sensível redução da área dos núcleos e células nos animais submetidos ao regime de jejum, registrando-se uma certa recuperação destes valores no período de realimentação. No entanto, este grupo mantém-se com uma diferença significativa em relação aos animais normalmente alimentadas, o que indica que esta recuperação não foi suficiente. No caso das áreas celulares verificou-se um alto grau de variabilidade dos valores entre os três grupos, o que em parte contribui para a diferença registada entre o grupo da realimentação e o controle, apesar dos valores serem tão próximos (24 e 22  $\mu\text{m}^2$ ).

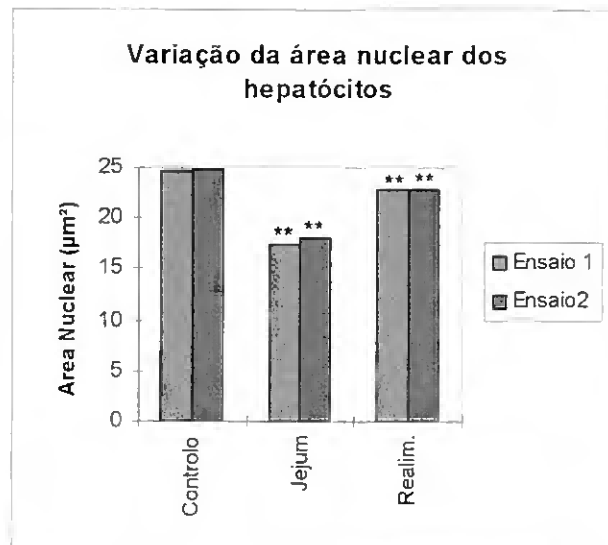
**Tabela 4.** Valores médios das áreas dos núcleos e dos hepatócitos ( $\mu\text{m}^2$ )  $\pm$  desvio padrão obtidos a partir de 250 medições feitas em 5 indivíduos de cada grupo experimental nos dois ensaios (total = 1500 medições).

	1º Ensaio (Outono)		2º Ensaio (Inverno)	
	Area Nuclear	Area Celular	Area Nuclear	Area Celular
Controlo	24,65 $\pm$ 2,4	229,4 $\pm$ 27,1	24,8 $\pm$ 2,7	235,51 $\pm$ 24,3
Jejum	17,45 $\pm$ 1,7**	140,38 $\pm$ 20,3**	18,8 $\pm$ 1,9**	150,39 $\pm$ 23,3**
Realimentação	22,73 $\pm$ 2,4**	221,04 $\pm$ 29,8**	22,83 $\pm$ 2,1**	228,91 $\pm$ 24,2**

\* Significativamente diferente do controlo a  $P < 0,05$

\*\* Significativamente diferente do controlo a  $P < 0,01$

Em ambos ensaios as variações apresentadas pelos grupos sujeitos ao tratamento foram bastante semelhantes, como ilustram as figuras 8 e 9, embora os efeitos do jejum parecem ter sido ligeiramente atenuados no Inverno, não havendo contudo diferenças significativas entre os ensaios.



**Figura 8.** Representação gráfica da tabela 4 .

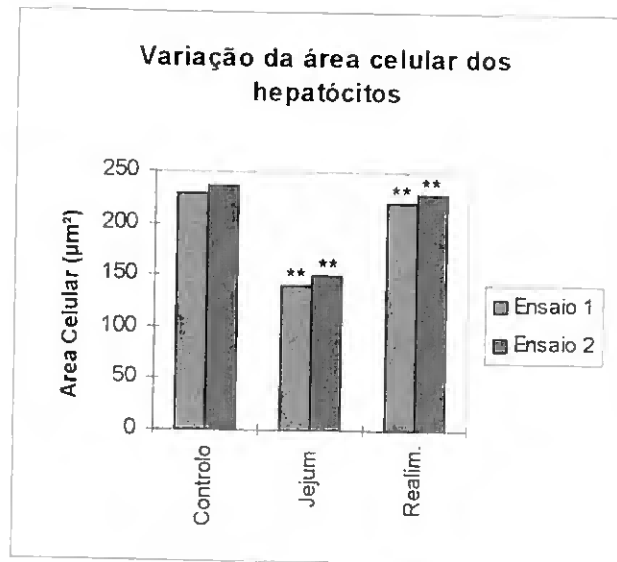


Figura 9. Representação gráfica da tabela 4.

#### 4.2 Análises biométricas

As tabelas 5 e 6 ilustram os dados biométricos de maior importância para este estudo, registados no final de cada ensaio. O peso corporal é dos parâmetros mais vulneráveis ao regime de privação alimentar, salientando-se a sua marcante redução nos animais em jejum; a realimentação tende a corrigir esta situação de emagrecimento, embora os valores ao final de cada ensaio ainda não estão próximos dos valores do grupo controlo, indicando ser o peso corporal um parâmetro de lenta recuperação (figura 10).

Tabela 5. Parâmetros biométricos médios  $\pm$  desvio padrão do 1º Ensaio (Outono).

	Incremento de Peso (%)	Comprimento (cm)	Índice Hepatosomat.	Índice Condição
Controlo (n=8)	13,43 $\pm$ 8,57	17,81 $\pm$ 0,56	1,79 $\pm$ 0,68	2,18 $\pm$ 0,17
Jejum (n=10)	-8,8 $\pm$ 3,55**	17,13 $\pm$ 1,02	0,68 $\pm$ 0,23**	1,70 $\pm$ 0,13*
Realim. (n=10)	1,07 $\pm$ 5,76**	17,81 $\pm$ 0,49	1,51 $\pm$ 0,22	1,86 $\pm$ 0,21

\* Significativamente diferente do controlo a  $P > 0,05$

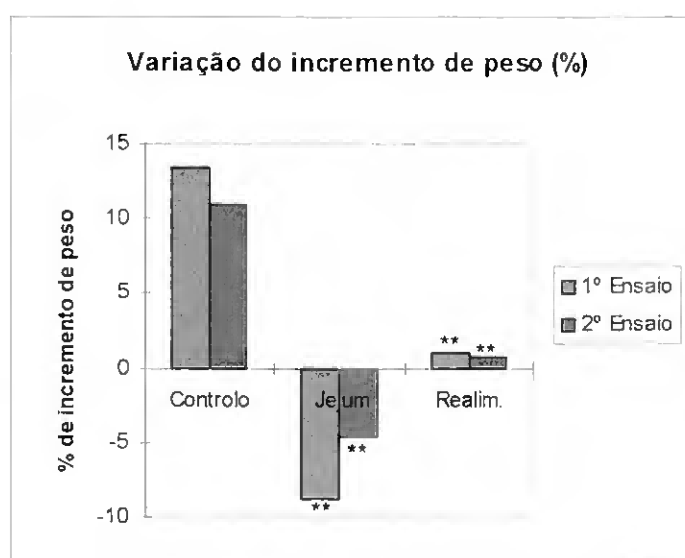
\*\* Significativamente diferente do controlo a  $P > 0,05$

**Tabela 6.** Parâmetros biométricos médios  $\pm$  desvio padrão do 2º ensaio (Inverno).

	Incremento de Peso (%)	Comprimento (cm)	Índice Hepatosomat.	Índice Condição
Contr.(n=16)	11,01 $\pm$ 6,56	19,85 $\pm$ 1,48	2,37 $\pm$ 0,51	1,96 $\pm$ 0,11
Jejum(n=8)	-4,6 $\pm$ 9,79**	18,79 $\pm$ 0,93	1,17 $\pm$ 0,25**	1,88 $\pm$ 0,11
Realim.(n=8)	0,78 $\pm$ 4,05**	18,98 $\pm$ 0,67	2,02 $\pm$ 0,24*	1,93 $\pm$ 0,10

\* Significativamente diferente do controlo a  $P > 0,05$

\*\* Significativamente diferente do controlo a  $P > 0,01$



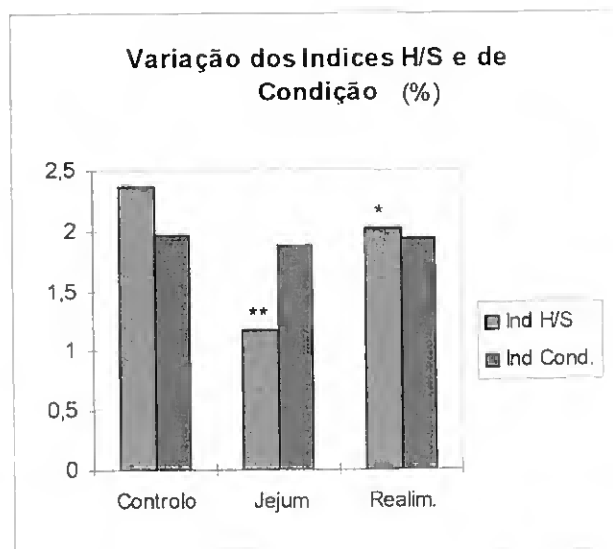
**Figura 10.** Representação gráfica das tabelas 5 e 6, relativamente ao incremento de peso (%) nos 1º e 2º ensaios (Outono e Inverno).

É de salientar que a comparação dos valores obtidos nos dois ensaios mostra, mais uma vez, que o efeito do jejum parece ter sido levemente mais acentuado no primeiro do que no segundo, onde a perda de peso foi menor no jejum, embora estatisticamente não tenham havido diferenças significativas entre as duas experiências. No segundo ensaio o grupo controlo teve um menor ganho de peso corporal o que justifica-se pela perda natural de apetite que os peixes manifestam no período de inverno.

Em relação ao comprimento, os valores mostram-se bastante homogêneos e dentro dos parâmetros normais para esta espécie, nesta faixa etária. Não existiram diferenças significativas entre os três grupos experimentais.

O índice hepatossomático é por sua vez um dos melhores indicadores do estado de nutrição do animal e é um dos parâmetros mais afectados pela falta de alimento. O jejum causa atrofia do fígado, que para além do tamanho diminui consideravelmente o seu peso, reflectindo directamente no índice hepatossomático. No entanto o retorno à alimentação normal parece induzir uma recuperação rápida aos valores próximos do normal, embora no segundo ensaio parece ter ocorrido de forma mais lenta.

Quanto ao índice de condição, este demonstrou ser menos afectado pelo estado nutricional do animal do que o índice hepatossomático, uma vez que relaciona peso e comprimento, o qual praticamente não sofreu alterações. Exceptua-se o grupo jejum do 1º ensaio que apresentou uma diferença significativa apenas ao nível de  $\alpha=0,05$ .



**Figura 11.** Representação gráfica da tabela 6, relativamente aos índices hepatossomático e de condição do 2º ensaio (Inverno).

### 4.3 Análises bioquímicas

Em todos os parâmetros bioquímicos estudados não foram registadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois ensaios.

Os níveis de glucose circulante do grupo jejum sofreram uma redução altamente significativa ( $P < 0,01$ ) em relação ao grupo controlo em ambos ensaios. No entanto, o período de realimentação mostrou uma rápida recuperação, retornando estes níveis aos padrões quase normais ao fim de uma semana (tabela 7).

**Tabela 7.** Valores médios de glucose plasmática (mg/dl)  $\pm$  desvio padrão nos dois ensaios.

	n	1º ensaio (Outono)	n	2º ensaio (Inverno)
Controlo	8	125,80 $\pm$ 24,54	16	132,20 $\pm$ 24,80
Jejum	10	77,80 $\pm$ 9,74**	8	87,52 $\pm$ 20,7**
Realimentação	10	121,36 $\pm$ 20,33	8	121,74 $\pm$ 25,65

\* Significativamente diferente do controlo a  $P < 0,05$

\*\* Significativamente diferente do controlo a  $P < 0,01$

Ao contrário da glucose, os níveis de proteína plasmática mantiveram-se estáveis nos três grupos experimentais, não demonstrando susceptibilidade ao jejum e a realimentação (tabela 8).

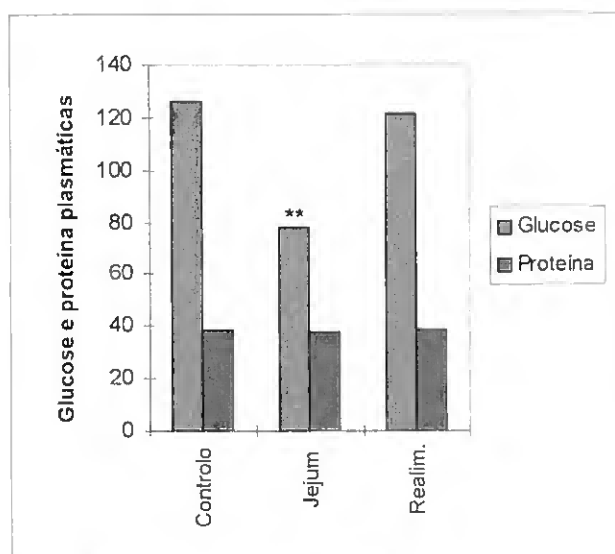
**Tabela 8.** Valores médios de proteína plasmática (mg/ml)  $\pm$  desvio padrão nos 1º e 2º ensaios (Outono e Inverno).

	n	1º ensaio (Outono)	n	2º ensaio (Inverno)
Controlo	8	38,37 $\pm$ 5,0	15	40,00 $\pm$ 6,1
Jejum	10	37,70 $\pm$ 6,8	8	38,00 $\pm$ 9,8
Realimentação	10	38,40 $\pm$ 3,3	8	41,88 $\pm$ 3,4

\* Significativamente diferente do controlo a  $P < 0,05$

\*\* Significativamente diferente do controlo a  $P < 0,01$

O comportamento destes dois parâmetros bioquímicos face ao tratamento está representando na figura 12.

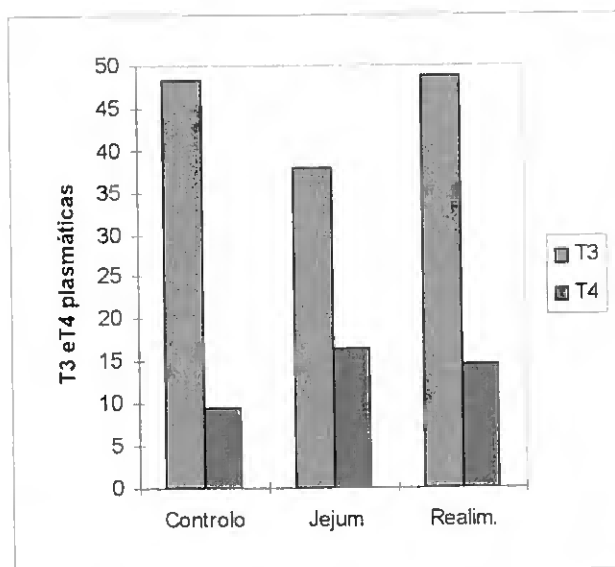


**Figura 12.** Representação gráfica das tabelas 7 e 8 .

No que diz respeito aos níveis plasmáticos de  $T_3$  e  $T_4$ , apesar destes terem apresentado alterações em resposta aos tratamentos, estas não foram significativas (tabela 9). Tal facto deve-se possivelmente a grande variabilidade dos resultados encontrados. No entanto é de registar que a tiroxina, em conjunto com a matéria húmida do músculo e do fígado são os únicos parâmetros bioquímicos que mostraram um aumento no jejum. Por sua vez, os hormonas da tireóide são os únicos que na realimentação apresentaram valores superiores aos do grupo controlo (figura 13).

**Tabela 9.** Valores plasmáticos médios de  $T_3$  e  $T_4$  ( ng/ml )  $\pm$  desvio padrão no 1º ensaio (Outono).

	$T_3$	$T_4$
Controlo (n=7)	48,40 $\pm$ 16,00	9,54 $\pm$ 5,94
Jejum (n=10)	37,92 $\pm$ 15,84	16,54 $\pm$ 9,49
Realimentação (n=9)	48,84 $\pm$ 12,74	14,70 $\pm$ 10,05



**Figura 13.** Representação gráfica da tabela 9 .

Os resultados referentes a percentagem de matéria húmida no músculo, representados na tabela 10, apontam para um aumento no grupo do jejum. Tal como já era esperado, a privação alimentar é responsável por uma maior hidratação deste tecido; em algumas espécies esta percentagem de matéria húmida do músculo pode chegar aos 88% numa situação de jejum (Love, 1970).

No fígado este mesmo parâmetro também sofre um aumento no grupo submetido à privação alimentar, apresentando uma correlação inversa com a percentagem de lípidos que, por sua vez, é reduzida (tabela 11).

**Tabela 10.** Teor de matéria húmida presente no músculo branco ( % ) ± desvio padrão.

	Matéria Húmida do Músculo (%)	
	1º ensaio (Outono)	2º ensaio (Inverno)
Controlo(n=10, 16)	78,62 ± 2,02	78,60 ± 1,32
Jejum(n=10,8)	80,97 ± 1,44*	80,84 ± 1,85*
Realimentação(n=8,10)	78,96 ± 1,25	79,14 ± 1,21

\* Significativamente diferente do controlo a  $P > 0,05$

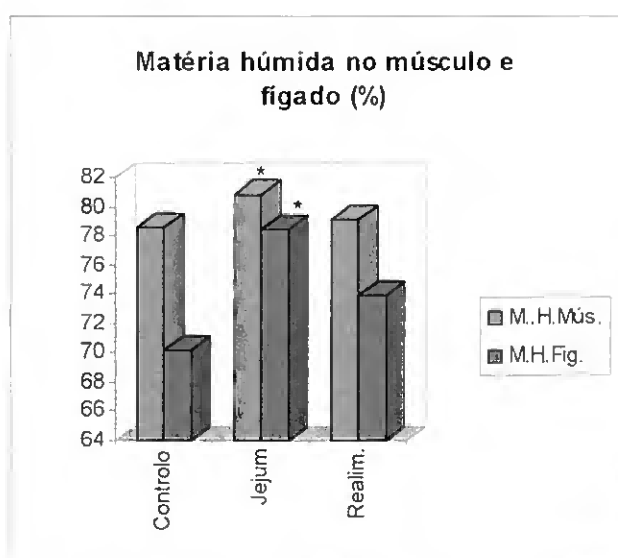
**Tabela 11.** Percentagem média de lípidos e matéria húmida presentes no fígado  $\pm$  desvio padrão.

	Lípidos	Mat.Húmida
Controlo (n=16)	8,09 $\pm$ 1,32	70,18 $\pm$ 3,38
Jejum(n=8)	4,05 $\pm$ 0,90**	78,47 $\pm$ 5,96
Realimentação(n=8)	7,35 $\pm$ 0,93	73,86 $\pm$ 4,38

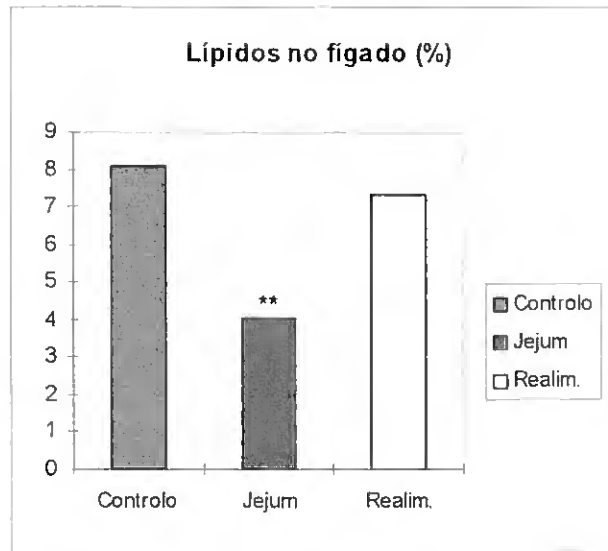
\*\* Significativamente diferente do controlo a  $P > 0,01$

Verificou-se que este aumento de percentagem da matéria húmida no fígado resultante da privação alimentar foi ainda mais significativo do que no músculo, como podemos observar na figura 14. Este acúmulo de água nos tecidos está relacionada ao metabolismo lipídico, pois como ilustra a figura 15, é bastante acentuada a diminuição da reserva lipídica do fígado durante o jejum.

Todos os parâmetros bioquímicos analisados mostraram sinais de uma eficiente recuperação após o período de realimentação, não se registando neste grupo valores significativamente diferentes do controlo.

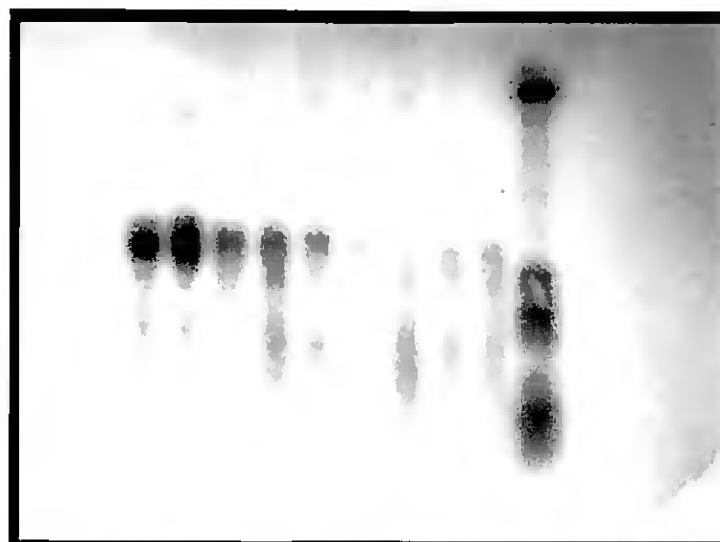


**Figura 14.** Representação gráfica das tabelas 10 e 11, relativamente às percentagens de matéria húmida do músculo e fígado no 2º ensaio (Inverno).



**Figura 15.** Representação gráfica da tabela 11, relativamente à percentagem de lípidos no fígado no 2º ensaio (Inverno).

Finalmente os resultados obtidos na análise do ARNm do fígado da dourada evidenciaram que a expressão da transiterina é reduzida mediante um regime de privação alimentar e, excepcionalmente em relação aos demais parâmetros testados, não retornou aos níveis normais após a administração de um regime normal de alimentação, como pode ser observado na figura 16.



**Figura 16.** Análise por Northern Blot do ARNm da transiterina na dourada (30 µg de ARN total purificados do fígado). Controlo 1-3; Jejum 4-6 ; Realimentação 7-9.

## 5 - DISCUSSÃO

As observações relativas ao estudo morfológico do fígado da dourada estão em concordância com os estudos realizados em outros teleósteos, sobretudo em salmonídeos (Eurell & Haensly, 1982; Rocha *et al.*, 1994; Gonzalez *et al.*, 1993) e confirmam o arranjo tubulosinusoide das células do tecido hepático. As estruturas morfológicas usadas como ponto de referência para a descrição histológica do fígado dos mamíferos, tais como a presença de veias centrolobulares e tríades portais (Rocha *et al.*, 1994), não são válidas para esta espécie.

Tal como já demonstrado por diversos autores (Segner & Braunbeck, 1988; Storch & Juario, 1982) são marcantes as alterações morfológicas do fígado face ao regime de privação alimentar, em especial a nível celular. O parênquima hepático mostra sinais de destruição celular, dando lugar à formação de vacúolos, para além da ocorrência de atrofia celular e nuclear e do aumento do espaço intercelular.

Estas alterações justificam-se pela redução das reservas energéticas das células, principalmente do glicogénio. Strussman & Takashima (1989) verificaram que a utilização do glicogénio como principal fonte de energia provoca um “encolhimento” das células e dos núcleos, facto este que será tanto mais notório quanto mais longo for o período de jejum e mais alta a temperatura de cultivo.

Os resultados obtidos em nosso estudo corroboram o conceito quase unânime entre os autores de que a célula hepática responde de forma imediata ao regime de alimentação a que é submetido o organismo, sendo por isso um excelente indicador do seu equilíbrio nutricional. No entanto não parece ter havido influência significativa da temperatura sobre estes efeitos neste trabalho.

Diversos estudos salientam os efeitos consequentes ao jejum a nível de ultraestrutura hepática (Segner & Braunbeck, 1988; Storch & Juario, 1982), sendo a organização intracelular seriamente afectada por esta condição drástica. Entre as organelas detectam-se aberrações nas mitocôndrias (hidratação), depleção do conteúdo ribossomal do retículo endoplasmático rugoso, redução da quantidade de gotas lipídicas e grânulos de glicogénio, hipertrofia de lisossomas. Na análise das secções histológicas deste trabalho teria sido enriquecedor o uso de microscopia

electrónica, de forma a aprofundar até que ponto o jejum influencia o funcionamento interno da célula hepática da dourada.

Neste estudo da microanatomia hepática teria sido igualmente valiosa a aplicação de técnicas de perfusão vascular do fígado, pois estas teriam permitido o conhecimento pormenorizado de toda a circulação hepática e das suas múltiplas ramificações.

Relativamente aos parâmetros biométricos, observou-se neste trabalho uma clara correlação entre o peso corporal e o índice hepatossomático das douradas. Ambos os factores demonstraram ser altamente sensíveis à privação alimentar. Tal facto justifica-se pela necessidade do organismo, perante uma situação de jejum, de recorrer às suas reservas energéticas, sob qualquer forma, no intuito de manter o seu metabolismo basal. A mobilização dos componentes corporais provoca a diminuição do peso; a não ingestão de alimentos resulta em atrofia do fígado, reduzindo o índice hepatossomático.

Este índice é um dos mais rápidos indicadores de mudanças nas condições ambientais podendo detectar sinais deletérios do organismo, antes mesmo destes se manifestarem a nível do seu desenvolvimento normal e do seu crescimento (Adams & McLean, 1985). Trata-se, portanto de um índice que, em conjunto com outros parâmetros metabólicos, permite estimar o nível de saúde e bem estar da dourada dentro de curtos períodos de tempo.

Por outro lado, o índice de condição não sofreu alterações significativas nos três grupos experimentais, uma vez que o crescimento das douradas, em termos de comprimento, parece não ter sido afectado pela falta de ingestão de alimento. De acordo com Love (1970) o uso do índice de condição como indicador da condição fisiológica de um organismo e do grau de severidade dos efeitos do jejum revela-se inadequado. A utilização deste índice é válida na avaliação a longo prazo do estado de populações de peixes em diferentes sistemas aquáticos, pois demonstra ser relativamente insensível a alterações de impacto mais imediato, tais como as nutricionais e ambientais.

Sabe-se que a privação alimentar é responsável por mudanças quantitativas a nível de composição dos tecidos. Desta forma, a determinação do teor de matéria húmida da carcaça ou músculo também pode vir a funcionar como mais um indicador do equilíbrio nutricional de um organismo. Os valores obtidos em nossos ensaios

confirmam as prévias observações de Miglavs & Jobling, 1988 e Collins & Anderson, 1995 de que o jejum causa na dourada um aumento na percentagem de matéria húmida do músculo e do fígado.

Uma das explicações para este aumento estaria relacionada com a necessidade do organismo em jejum de mobilizar energia a partir dos lípidos; o processo de oxidação dos ácidos gordos liberta água e dióxido de carbono, levando à hidratação dos tecidos (Halver, 1988). Tal facto leva-nos à conclusão de que há uma relação inversa entre a percentagem de lípidos nestes tecidos e a de matéria húmida, onde os lípidos catabolizados são substituídos por igual volume de água.

A monitorização dos parâmetros bioquímicos conduziu-nos de uma forma geral a resultados coerentes. Os valores registados para a glucose plasmática e a significativa queda da sua concentração nos grupos em jejum, aliados a uma redução considerável do glicogénio hepático em ambos ensaios, representam um interessante processo metabólico. Bioquimicamente, o nível de glucose circulante poderia também ser considerado um bom indicador do stress causado pelo jejum, uma vez que nos teleósteos os níveis do grupo controlo raramente situam-se abaixo dos 50 mg/100ml (Mahajan & Dheer, 1983).

O declínio nos níveis da glucose plasmática circulante observado nas douradas privadas de alimento é um resultado registado por diversos autores em outras espécies submetidas a diferentes períodos de jejum. Machado *et al* (1988) reportou a ocorrência de hipoglicemia em peixes da espécie *Rhamdia hylariti* após 30 dias de jejum; Moon *et al.* (1990) em trutas arco-íris após 6 semanas sem alimento e Ince & Thorpe (1976) em *Exos lucius* após 3 meses de jejum. Na falta de ingestão de alimento, a glucose é utilizada pelos teleósteos como um dos primeiros e mais disponíveis recursos energéticos.

Contudo, na dourada o processo de gluconeogénese, o qual permitiria manter as reservas de glicogénio e os níveis de glucose circulante em padrões estáveis, parece não ter ocorrido a nível satisfatório. Seria de esperar que através da glicogenólise o glicogénio hepático fosse metabolizado em glucose de forma a compensar a falta de ingestão de alimento, atenuando os efeitos do jejum. Desta forma os grupos sujeitos ao jejum apresentariam redução no teor de glicogénio hepático, pois este seria utilizado para esta reposição de glucose. Registaríamos, portanto os mesmos níveis de glucose no

plasma que os grupos controlo, mantendo-se a sua concentração praticamente igual nos três grupos experimentais.

Para uma possível explicação destes resultados vários factores podem ser invocados. O período de jejum a que foram submetidas as douradas (3 semanas) pode não ter sido longo o suficiente para que a gluconeogénese fosse estimulada, de forma a actuar com eficiência na compensação da glucose plasmática. Alguns estudos (Machado *et al.*, 1988) referem a lentidão do processo de gluconeogénese no início do jejum, marcado pelos baixos níveis de glicogénio hepático e glucose circulante. Verificou-se que, ultrapassado o impacto inicial do jejum, os níveis destes metabolitos tendiam a estabilizar-se ao fim de 2 a 3 meses de duração do ensaio, retornando a parâmetros quase normais. Tal ocorrência deve-se a uma reactivação da gluconeogénese, provavelmente às custas do uso de proteína muscular (Navarro *et al.*, 1991).

Teria sido de todo o interesse no estudo destes parâmetros bioquímicos a determinação quantitativa de certas hormonas relacionadas à regulação metabólica da glucose, tais como o glucagon e a insulina. Em hepatócitos isolados de juvenis da espécie *Oncorhynchus kisutch* Plisetskaya *et al.* (1984) verificaram que o glucagon actua como um potente activador da gluconeogénese e da glicogenólise. Seria esclarecedor detectar os níveis de glucagon nas douradas normalmente alimentadas e naquelas que permaneceram em jejum.

Uma outra explicação para a hipoglicemia da dourada na situação de jejum seria um aumento na secreção de insulina, embora em mamíferos é sabido que os níveis de insulina são reduzidos numa situação semelhante (Lewis & Epple, 1972).

Gutierrez *et al.* (1984), em estudos realizados no robalo (*Dicentrarchus labrax*), demonstrou que os níveis diários de insulina nesta espécie são variáveis, sendo influenciados por diversos factores tais como: momento da amostragem, fotoperíodo, composição das dietas, horário da alimentação. No entanto não há registo de estudos semelhantes para a dourada, mas por dificuldades na obtenção de material para a realização de um radioimunoensaio não foi possível determinar atempadamente a concentração de insulina neste estudo. Num trabalho futuro será vantajoso e de grande interesse estudo analisar o comportamento da insulina nas douradas, tanto no regime de alimentação normal, quanto no de privação alimentar.

Outro factor que parece também ter influência na resposta destes metabolitos (glucose e glicogénio) ao jejum é a composição da dieta com a qual os animais estavam a ser alimentados antes do ensaio experimental, em especial no que diz respeito aos teores de proteína e hidratos de carbono. No presente trabalho os peixes foram mantidos com uma ração relativamente equilibrada, contendo 21% de proteínas, 57% de hidratos de carbono e 5% de lípidos; alguns autores (Cowey & Walton, 1988) atribuem aos peixes alimentados com uma ração oposta a esta, ou seja, rica em proteínas e pobre em hidratos de carbono, uma maior resistência aos efeitos do jejum. Tal não se verificou neste trabalho onde a glucose plasmática e o glicogénio foram significativamente reduzidos no regime de abstenção de alimento.

Um bom complemento para este estudo e que talvez permitisse uma melhor compreensão dos resultados teria também sido a análise da actividade de algumas das enzimas mais importantes na regulação do metabolismo da glucose e do glicogénio, tais como a glucose-6-fosfatase ou outras mediadoras da gluconeogénese.

Para além destes metabolitos foi marcante a resposta do fígado, em termos de seu conteúdo lipídico, face à privação alimentar. Registou-se uma sensível depleção dos lípidos hepáticos na dourada o que confirma as conclusões prévias de diversos autores (Jeziarska *et al.*, 1982; Denton & Yousef, 1976). Estudos sobre os lípidos como fonte de energia para o metabolismo dos peixes tem revelado a sua importância durante períodos de stress tais como o jejum e as migrações invernais (Pastoureaud, 1995).

A mobilização de lípidos para fins energéticos envolve a metabolização de triglicérides em ácidos gordos livres, dando o organismo preferência à mobilização de ácidos gordos saturados uma vez que a sua oxidação requer menor uso de energia (Jobling, 1980). A percentagem de lípidos que permanece no fígado durante o jejum parece ser a mínima requerida para a manutenção do seu funcionamento e integridade celular.

Sendo o fígado o primeiro órgão onde os lípidos são mobilizados nos estágios iniciais da abstenção alimentar, outros locais também contribuem como reservas endógenas para esta reposição de “combustível” ao organismo, tais como o músculo, intestino e estômago. É de salientar que estes tecidos também são ricos em depósitos de lípidos sendo os responsáveis pelo fornecimento de energia ao organismo numa segunda fase, quando o fígado atinge o seu limite de depleção.

Os lípidos surgem assim como o principal recurso do metabolismo da dourada face ao jejum, pois representam a forma de energia mais compacta existente no organismo. Na maior parte das espécies, a gordura parece ser o mais importante material de armazenamento energético pois é o que apresenta maior conteúdo calórico por peso e a redução de glicogénio e proteína ocorre apenas quando a maior parte dos lípidos foram utilizados (Stirling, 1976).

Na dourada, observou-se no jejum considerável redução na concentração de glucose circulante, lípidos e glicogénio hepáticos mas não se registaram diferenças entre os níveis de proteína plasmática nos três grupos experimentais. Para muitas das espécies de peixes carnívoros, entre os quais a dourada, a proteína é considerada a principal fonte de energia e muitos estudos tem utilizado a determinação do nitrogénio excretado como um indicador das suas taxas metabólicas (Guerin-Ancey, 1976 citado por Jobling, 1980). No entanto, durante a privação alimentar não estão disponíveis aos peixes fontes de proteína exógena, pelo que estes são forçados a mobilizar outras reservas endógenas, sendo escolhidos preferencialmente os lípidos e o glicogénio hepáticos para tal finalidade.

Neste trabalho a determinação do teor de proteína do músculo no jejum teria sido talvez uma contribuição para a melhor compreensão dos mecanismos de mobilização de energia, pois a redução do peso corporal foi um resultado bastante significativo, evidenciado nos grupos em jejum dos dois ensaios. Contudo, Collins & Anderson (1995) apontam para o facto de que apenas em condições extremas de abstenção alimentar a utilização da proteína seria detectável em termos de alterações em sua concentração. Possivelmente a duração do período de jejum dos nossos ensaios não seria suficiente para tal demonstração.

O catabolismo das reservas teciduais está sob o controlo de hormonas adrenocorticais e entre estas o cortisol parece ser uma das mais importantes na activação da proteólise, na mobilização lipídica e na gluconeogénese hepática. Diversas investigações evidenciam o aumento dos níveis de cortisol durante o jejum assim como também da hormona de crescimento não só em peixes como também em mamíferos (Pérez-Sanches *et al.*, 1994; Straus & Takemoto, 1990). Não resta dúvida que a análise deste hormonas teria sido mais um ponto de referência importante em nosso estudo, ficando assim esta sugestão para um trabalho futuro.

Relativamente à análise das concentrações de  $T_3$  e  $T_4$  no plasma, os resultados foram de certa forma controversos, parecendo ter havido na dourada uma relação inversa entre estas hormonas, contrariamente ao que foi descrito por Holloway *et al.* (1994) em *Oncorhynchus mykiss*, onde uma correlação significativa entre ambos foi detectada. É de salientar que nos peixes de água doce a concentração de  $T_4$  é mais alta do que a de  $T_3$ , ao contrário do que se observa nos peixes marinhos.

É sabido e documentado (Leatherland, 1982) que a privação alimentar provoca uma redução drástica nos níveis das hormonas da tireóide. Neste trabalho apesar das diferenças entre os grupos tratados e o controlo não terem sido estatisticamente significativas, provavelmente devido a elevada variância observada em cada grupo, não foi de forma alguma desprezível a redução dos níveis de triiodotironina plasmática detectada no grupo submetido ao jejum. Tal observação corrobora a ideia de que o estado nutricional exerce influências consideráveis nos níveis médios e nos ritmos diários de metabolitos e hormonas (Weatherley & Gill, 1981).

Neste contexto, reveste-se de grande interesse proceder à comparação entre os resultados relativos às hormonas da tireóide e os relativos a transiterina, pois esta desempenha uma função importante no transporte dos mesmos. Observou-se uma redução acentuada da expressão de transiterina no grupo jejum, comparado ao grupo controlo; mesmo no grupo de realimentação não houve sinais de recuperação, como a seguir veremos, foi característica em quase todos os parâmetros estudados. Tais resultados sugerem que, assim como já foi constatado em vertebrados superiores, a nutrição pode influenciar a expressão de transiterina no fígado (Hayden *et al.*, 1994). Esta proteína também poderia ser destinada à função de indicador do estado nutricional da dourada.

No que diz respeito aos grupos experimentais sujeitos a realimentação, foi um achado comum em nosso trabalho o retorno a valores bastante próximos do grupo controlo em quase todos os parâmetros testados, com excepção do nível de expressão da transiterina e da percentagem de incremento de peso. Nestes parâmetros os valores, de facto, apresentaram-se semelhantes ao grupo jejum, mostrando apenas um início de recuperação no incremento de peso. Este foi severamente afectado pelos efeitos da privação alimentar o que nos leva a constatar que provavelmente o período de realimentação não tenha sido longo o suficiente para que o organismo pudesse recuperar o peso perdido no jejum.

Apesar das marcantes alterações causadas pelo jejum foi notável a capacidade demonstrada pela dourada em recuperar a normalidade dos seus parâmetros, tanto a nível morfológico quanto funcional, mesmo após um período de realimentação tão curto. Tais factos confirmam as observações prévias de alguns autores (Ince & Thorpe, 1976; Weatherley & Gill, 1981) que referem, em certas espécies, não somente uma recuperação, mas também uma subida dos valores em relação ao normal, nomeadamente a nível de crescimento. Parece ocorrer nestes casos um mecanismo de “supercompensação” metabólica desencadeada pelo período de privação alimentar. Alguns autores observaram em mamíferos que estes tornavam-se hiperfágicos quando realimentados após o jejum, demonstrando melhorar a sua taxa de conversão alimentar (Dobson & Holmes, 1984 cit. por Miglavs & Jobling, 1988).

Neste trabalho os únicos parâmetros do grupo realimentado superiores aos do controlo foram os dos hormonas da tireóide ( $T_3$  e  $T_4$ ). Porém o período de realimentação dos nossos ensaios foi reduzido, o que não nos permitiu inferir conhecimentos sobre o comportamento dos demais parâmetros ao longo do tempo. De qualquer forma, a recuperação dos valores aos padrões normais, na realimentação, indicam estar presente na dourada a capacidade de rapidamente reajustar o seu metabolismo, o que a favorece em termos adaptativos.

Relativamente à temperatura de cultivo não houve em qualquer dos parâmetros estudados diferenças significativas entre os dois ensaios, observando-se até mesmo uma grande homogeneidade entre eles em oposição ao que era previsto. Sabe-se que para muitas espécies de peixes os efeitos do jejum são intensificados em temperaturas mais altas (Love, 1970), em consequência a um aumento da taxa metabólica do organismo.

De facto a eficiência de utilização dos alimentos e o metabolismo são parâmetros quantitativa e qualitativamente afectados pelas condições ambientais, principalmente pela temperatura, como mostram os trabalhos efetuados por Kaushik, 1986 e Gutierrez, 1984. No entanto, um ajuste interno pode ser desencadeado no organismo de modo a minimizar os efeitos desta mudança, mantendo o metabolismo tão normal quanto possível (Love, 1970).

O comportamento dos peixes frente a mudanças de temperatura é variável de espécie para espécie. Dentro da mesma espécie também pode variar em função da idade, sexo, ciclo de vida, estado reprodutivo etc. Observou-se na dourada que a diferença de temperatura de cultivo entre o Outono(21°C) e o Inverno (14° C) não teve influência no seu mecanismo de resposta à privação alimentar. Mais uma vez , este tipo de mecanismo parece estar relacionado com o grau de restrição e a história nutricional prévia dos peixes. Para além destes factores, teria sido útil medir o consumo de oxigênio em ambos os ensaios, pois este tende a ser maior em temperaturas, surgindo assim como um potencial indicador da taxa metabólica dos peixes.

## 6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

É de salientar que a dinâmica metabólica que envolve o jejum é um processo complexo. Certamente muitos pontos ficaram ainda por esclarecer neste estudo, pelo que outras investigações deverão continuar em curso. Entre os pontos que requerem estudos mais detalhados podemos sugerir os seguintes:

- . Repetição do ensaio com um período de jejum e de realimentação mais longos e com um maior número de exemplares.
- . Realização de amostragens periódicas ao longo do ensaio.
- . Realização de amostragens ao longo de um dia, em horários diferentes.
- . Determinação dos níveis de glicogénio e lípidos do músculo.
- . Medição do colesterol plasmático (relacionado com o metabolismo lipídico).
- . Determinação da concentração de outras hormonas importantes para o metabolismo, tais como a insulina, o glucagon e o cortisol.
- . Determinação da percentagem de gordura visceral e corporal, pois esta tende a sofrer uma redução durante o inverno, nas migrações e na reprodução.

A estratégia eleita pela dourada para adaptar-se à privação alimentar é coerente com a origem das suas fontes energéticas. As reservas hepáticas surgem como o ponto de partida e a fonte inicial de energia endógena disponível para responder ao jejum. A rápida recuperação dos efeitos do jejum, quando do retorno ao regime de alimentação normal, demonstram que esta espécie é capaz de lidar de forma eficiente com mudanças na disponibilidade de alimento, incluindo a total falta do mesmo. Pode-se afirmar que a dourada é uma espécie bem adaptada a um meio ambiente em que a disponibilidade de alimento é altamente variável.

De uma forma geral, ao avaliar-se os efeitos do jejum na dourada, tal como em outras espécies estudadas, torna-se evidente a tendência dos vários tecidos de apresentar uma redução similar e proporcional. O produto final resulta num animal mais “magro”, mas cujos órgãos e tecidos ainda mantêm a mesma proporção entre si e em relação ao organismo como um todo. Portanto este organismo continua a funcionar, pelo menos temporariamente, sem danos irreversíveis aos tecidos.

Em termos de aquacultura, tendo em conta estas observações, o jejum ou mesmo a restrição na quantidade de alimento artificial administrado aos animais pode ter aspectos benéficos. Nos cultivos intensivos, onde a carga animal é elevada, o sedimento resultante do alimento não aproveitado pelos animais, rico em material orgânico, contribue para a poluição do meio ambiente aquático. Assim sendo o jejum na aquacultura traria vantagens não só do ponto de vista económico como também de proteção ambiental.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

**Adams, S. M. & McLean, R. B.** (1985). Estimation of largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacépède, growth using the liver somatic index and physiological variables. *Journal of Fish Biology*, **26**: 111 - 126.

**Biagiанти-Risbourg, S.** (1991). Fine structure of hepatocytes in juvenile grey mullets: *Liza saliens* Risso, *L. ramada* Risso and *L. aurata* Risso (Teleostei, Mugilidae). *Journal of Fish Biology*, **39**: 687 - 703.

**Black, D. & Love, M. R.** (1988). Estimating the carbohydrate reserves in fish. *Journal of Fish Biology*, **32**: 335 - 340.

**Bucke, D. & Feist, S. W.** (1993). Histopathological changes in the livers of dab, *Limanda limanda* (L.). *Journal of Fish Diseases*, **16**: 281 - 296.

**Chapman, G. B.** (1981). Ultrastructure of the liver of the fingerling rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, **18**: 553 - 567.

**Chomczynski, P. & Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction, *Analytical Biochemistry*, **162**: 156 - 159.

**Collins, A. L. & Anderson, T. A.** (1995). The regulation of endogenous energy stores during starvation and refeeding in the somatic tissues of the golden perch. *Journal of Fish Biology*, **47**: 1004 - 1015.

**Cowey, C. B.; Walton, M. J.** (1988). "Intermediary metabolism" in Fish Nutrition, ed. John E. Halver, second edition, Academic Press, 798 p.

**Cowley, D. J.; Sheridan, M. A.** (1993). Insulin stimulates hepatic lipogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry*, **11(1)**: 421 - 428.

**De Silva, S. S. & Anderson, T. A.** (1995). *Fish Nutrition in Aquaculture*. Chapman & Hall, London, 319 p.

**Denton, J. E. & Yousef, M. K.** (1976). Body composition and organ weights of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Fish Biology*, **8**: 489 - 499.

**Eckert, R. ; Randall, D. ; Augustine, G.** (1988). *Animal Physiology Mechanisms and Adaptations*, third edition, W. H. Freeman and Company, New York, 644 p.

**Elias, H. & Begensdorff, H.** (1952). The structure of the liver of the vertebrates. *Acta anatomica*, **14**: 297 - 337.

**Elias, H.** (1953). Observations on the general and regional anatomy of the human liver. *Anatomical Record*, **117**: 377 - 394.

**Eurell, J. & Haensly, W.** (1982). The histology and ultrastructure of the liver of the Atlantic croaker *Micropogon undulatus* L. *Journal of Fish Biology*, **21**: 113 - 125.

**Garcia de Frutos, P.; Bonamusa, L.; Fernandez, F.; Baanante, I.** (1990). Fructose-2-6-biphosphatase in liver of *Sparus aurata*: Influence of nutritional stage. *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. **96(1)**: 63 - 65.

**Gonzalez, G.; Crespo, S.; Brusle, J.** (1993). Histo-cytological study of the liver of the cabrilla sea bass, *Serranus cabrilla* (Teleostei, Serranidae), an available model for marine fish experimental studies. *Journal of Fish Biology*, **43**: 363 - 373.

**Gutierrez, J. ; Carrillo, M.; Zanuy, S.; Planas, J.** (1984). Daily rhythms of insulin and glucose levels in the plasma of seabass *Dicentrarchus labrax* after experimental feeding. *General and Comparative Endocrinology*, **55**: 393 - 397.

**Halver, J. E.** (1989). Fish Nutrition, second edition, Academic Press, San Diego, CA.

**Hampton, J. A.; McCuskey, P. A.; McCuskey, R. S.; Hinton, D. E.** (1985). Functional units in rainbow trout ( *Salmo gairdneri* ) liver: arrangement and histochemical properties of hepatocytes. *The Anatomical Record*, **213**: 166 - 175.

**Hayashi, S. & Ooshiro, Z.** (1985). Effects of glucagon, insulin, and the eel serum in the eel liver cells in primary culture. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **51(7)**: 1123 - 1127.

**Hayden, J. M.; Marten, N. W.; Burke, E. J.; Straus, D. S.** (1994). The effect of fasting on insulin-like growth factor-I nuclear transcript abundance in rat liver. *Endocrinology*, **134(2)**: 760 - 768.

**Hepher, B.** (1988). Nutrition of Pond Fishes. Cambridge University Press, Cambridge, 388 p.

**Hinton, D. & Pool, C.** (1976). Ultrastructure of the liver in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Biology*, **8**: 209 - 219.

**Holloway, A. C.; Reddy, P. K.; Sheridan, M. A.; Leatherland, J. F.** (1994). Diurnal Rhythms of Plasma Growth Hormone, Somatostatin, Thyroid Hormones, Cortisol and Glucose Concentrations in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, during Progressive Food Deprivation. *Biological Rhythm Research*, **25**: 415 - 432.

**Ince, B. W. & Thorpe, A.** (1976). The effects of starvation and force-feeding on the metabolism of the Northern pike, *Exos lucius L.* *Journal of Fish Biology*, **8**: 79 - 88.

**Jeziarska, B.; Hazel, J. R. ; Gerking, S. D.** (1982). Lipid mobilization during starvation in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with attention to fatty acids. *Journal of Fish Biology*, **21**: 681 - 692.

**Jobling, M.** (1980). Effects of starvation on proximate chemical composition and energy utilization of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Journal of Fish Biology*, **17**: 325 - 334.

**Junqueira, L.; Carneiro, J.; Kelley, R. O.** (1992). Basic Histology, seventh edition, Prentice Hall International Inc.

**Kaushik, S. J.** (1986). Environmental effects on food utilization. *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. **2(4)**: 131 - 140.

**Leatherland, J. F.** (1982). Effect of a commercial trout diet on liver ultrastructure of fed and fasted yearling coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* Walbaum. *Journal of Fish Biology*, **21**: 311 - 319.

**Lehninger, A. L.** (19??). The molecular basis of cell structure and function, Worth Publishers, Inc., Second edition, 1104 p.

**Lewis, T. L.; Parke, W. W.; Epple, A.** (1977). Pancreatectomy in a teleost fish, *Anguilla rostrata* ( American eel). *Laboratory Animal Science*, vol. **27**: 102 - 109.

**Love, M.** (1970). The Chemical Biology of Fishes, Academic Press, 547 p.

**Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Jour. Biol. Chem.* **193**: 265 - 275.

**Machado, C. R.; Garofalo, M. A. R.; Roselino, J. E. S.; Kettelhut, I. C.; Migliorini, R. H.** (1988). Effects of starvation, refeeding, and insulin on energy-linked

metabolic processes in catfish (*Rhamdia hilarii*) adapted to a carbohydrate-rich diet. *General and Comparative Endocrinology*, **71**: 429 - 437.

**Mahajan, C. L. & Dheer, T. R.** (1983). Haematological and hematopoietic responses to starvation in air-breathing fish *Channa punctatus* Bloch. *Journal of Fish Biology*, **22**: 111 - 123.

**Mehner, T. & Wieser, W.** (1994). Energetics and metabolic correlates of starvation in juvenile perch (*Perca fluviatilis*). *Journal of Fish Biology*, **45**: 325 - 333.

**Miglav, I. & Jobling, M.** (1988). The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Journal of Fish Biology*, **35**: 1 - 11.

**Moon, T. W. & Johnston, I. A.** (1980). Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscles and liver of plaice, *Pleuronectes platessa*. *Journal of Comp. Physiology*, **136**: 31 - 38.

**Morales, J. C.** (1986). Acuicultura marina animal. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 670 p.

**Navarro, I.; Canals, P.; Sanchez, J.; Gutierrez, J.; Planas, J.** (1991). Some plasma hormones and metabolites in the pyrenean brown trout (*Salmo trutta fario*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **100**: 919 - 923.

**Palmer, T. N. & Ryman, B. E.** (1972). Studies on oral glucose intolerance in fish. *Journal of Fish Biology*, **4**: 311 - 319.

**Pastoureaud, A.** (1995). Influence of starvation at low temperatures on utilisation of energy reserves, appetite recovery and growth character in seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, **99**: 167 - 178.

**Perez-Sanchez, J.; Marti-Palanca, H.; Le Bail, P-Y.** (1994). Homologous growth hormone (GH) binding in gilthead seabream ( *Sparus aurata* ). Effect of fasting and refeeding on hepatic GH-binding and plasma somatomedin-like immunoreactivity. *Journal of Fish Biology*, **44**: 287 - 301.

**Pillay, T. V. R.** (1990). Aquaculture principles and practices. Fishing News Books, Oxford, 529 p.

**Plisetskaya, E.; Bhattacharya, S.; Dickhoff, W. W.; Gorbman, A.** (1984). The effect of insulin on amino acid metabolism and glycogen content in isolated liver cells of juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. **78(A)**: 773 - 779.

**Rocha, E.; Monteiro, R.; Pereira, C.** (1994). The liver of the brown trout, *Salmo trutta fario*: a light and electron microscope study. *Journal of Anatomy*, **185**: 241 - 249.

**Schmidt-Nielsen, K.** (1985). Animal Physiology : Adaptation and Environment, third edition, Cambridge University Press, Cambridge, 619 p.

**Segner, H. & Braunbeck, T.** (1988). Hepatocellular adaptation to extreme nutritional conditions in ide, *Leuciscus idus melanotus* L. (Cyprinidae). A morphofunctional analysis. *Fish Physiology and Biochemistry*, **5**: 79 - 97.

**Stirling, H. P.** (1976). Effects of experimental feeding and starvation on the proximate composition of the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Marine Biology*, **34**: 85 - 91.

**Storch, V. & Juario, J. V.** (1983). The effect of starvation and subsequent feeding on the hepatocytes of *Chanos chanos* (Forsskal) fingerlings and fry. *Journal of Fish Biology*, **23**: 95 - 103.

**Straus, D. S. & Takemoto, C. D.** (1990). Effect of dietary protein deprivation on insulin-like growth factor (IGF)-I and -II, IGF binding protein-2, and serum albumin gene expression in rat. *Endocrinology*, vol. **127**, n° 4, 1849 - 1860.

**Strussmann, C. A. & Takashima, F.** (1989). Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). *Journal of Fish Biology*, **36**: 59 - 65.

**Stryer, L.** (1981). Biochemistry , second edition, W. H. Freeman and Company, New York, 1089 p.

**Sundby, A. ; Eliassen, K. A.; Blom, A. K. ; Asgard, T.** (1991). Plasma insulin, glucagon, glucagon-like peptide and glucose levels in response to feeding, starvation and life long restricted feed ration in salmonids. *Fish Physiology and Biochemistry*, **9**: 253 - 259.

**Weatherley, A. H. & Gill, H. S.** (1981). Recovery growth following periods of restricted rations and starvation in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, **18**: 195 - 208.

**Weatherley, A. H. & Gill, H. S.** (1987). The Biology of Fish Growth. Academic Press Inc., San Diego, 443 p.

**Wilson, J. A.** (1979). Principles of Animal Physiology, second edition, Collier MacMillan International Editions, New York, 891 p.

**Yufer, M.; Pascual, E.; Polo, A.; Sarasquete, M. C.** (1993). Effect of starvation on the feeding ability of gilthead seabream ( *Sparus aurata* ) larvae at first feeding. *Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **169**: 259 - 272.

